UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
SEP 3 '59

EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER (Basel) · R. MATTHEY (Lausanne) · A. v. MURALT (Bern) · L. RUZICKA (Zürich)
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

SOMMAIRE – INHALT – SOMMARIO – CONTENTS

F. F. Nord and W. J. Schubert: Lignin and the Formation of Wood 245

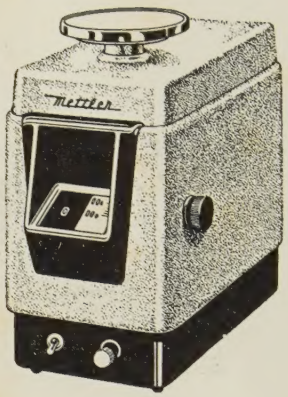
Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

A. Kjær, P. Olesen Larsen, and R. Gmelin: Structure of Albizziine[L(–)-2-Amino-3-ureidopropionic Acid], an Amino Acid from Higher Plants (*Mimosaceae*) 253
M. Goldstein, A. J. Friedhoff, C. Simmons, and N. N. Prochoroff: The Metabolism of 3-Hydroxytyramine-1-C^{14} in Brain Tissue Homogenates 254
R. E. Humbel: Messung der Serum-Insulin-Aktivität mit epididymalem Ratten-Fettgewebe *in vitro* 256
L. Neipp, W. Kunz et R. Meier: Relations du «métabolisme respiratoire» des bactéries et du type de bactériophage avec l'activité de substances antiphages 258
Elisabeth Hauschteck: Über die Zytologie der Parthenogenese und der Geschlechtsbestimmung bei der Gallmücke *Oligarces paradoxus* Mein. 260
E. Ghislandi: Chromatographic Analysis of the Urinary Melanin Pigment 261
M. Carissimi, F. Ravenna, E. Milla e E. Grumelli: Studio farmacologico di un nuovo coleretico derivato dall'acido α-cicloesil butirrico. 262
E. Läuppi und A. Studer: Hemmung der experimentellen, testosteronbedingten Epidermisproliferation an der weiblichen Ratte durch ein synthetisches Phenanthrenderivat mit antiandrogener Wirkung 264
H. P. Bächtold und A. Pletscher: Abschwächung der Noradrenalin-Wirkung auf die isolierte Aorta bei Hemmung der Monoaminoxydase 265
R. A. Maxwell, R. P. Mull, and A. J. Plummer: [2-(Octahydro-1-azocinyl)-ethyl]-guanidine sulfate (CIBA 5864-SU), a New Synthetic Antihypertensive Agent 267
M. Hill and M. Pospíšil: On the Relation between the Secretion of the Perivascular Mast Cells and the Serum Level of Mucoproteins 267
H. Bornschein und S. E. Charif: Die Bedeutung konstanter Temperaturbedingungen für ERG-Untersuchungen bei Kleinsäugern 269
A. Borovanský, A. Sekera und Č. Vrba: Eine neue Serie wenig toxischer Lokalanästhetika aus der Xylocain-Reihe 270
W. Scheler und W. Schwartzkopff-Jung: A Contribution to the Problem of the Haem-Protein-Linkage in Haemoglobin (Disputandum) 272
E. H. Strickland, A. Anthony, and E. Ackerman: A Method for Purifying Rat Myoglobin for Kinetic Studies 273
A. Novelli: Rapid Staining of Mitochondria (Pro Experimentis) 274

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

W. Kuhn, H. J. Kuhn, D. H. Walters, H. Majer und H. Eglin: Experimentelle Feststellung dualer Potentiale an intra-nicht-permutierenden Membranen (Cogitationes) 275
G. L. Szendey: Gallen und Gallensäuren. Papierchromatographische Untersuchungen (Studiorum Progressus) . . 278
A. C. Allison: Identification of Human Serum Proteins Binding Iron, Copper, and Thyroid Hormones by Starch Gel Electrophoresis (Studiorum Progressus) 281

E. Mettler
Pelikanstrasse 19
Zürich



Die modernen
Schnellwaagen
für Industrie
Gewerbe
und Handel

P 4

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XIV/4

Ciba AG., Basel
Ganz Optar AG., Zürich
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel
Leo Pharmaceutical Products, Copenhagen
Maggioni & C., S. p. A., Milano
E. Mettler, Zürich
Sandoz AG., Basel
Dr. Schwarz, Arzneimittelfabrik GmbH, Monheim

Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:
Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de poste des pays suivants:

Italien	Belgien, Luxemburg	Dänemark	Schweden	Portugal
Deutschland	Holland	Norwegen	Finnland	Marokko

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an frs. 68.–. Ce prix s'entend en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt Fr. 68.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e puo esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 68.–. Il prezzo vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription is fr. 68.–. Price in Swisscurrency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

© *1959 Birkhäuser Verlag, Basel 10 Schweiz, Elisabethenstrasse 19, Telephon (061) 231810; Telegrammadresse: Edita Basel*

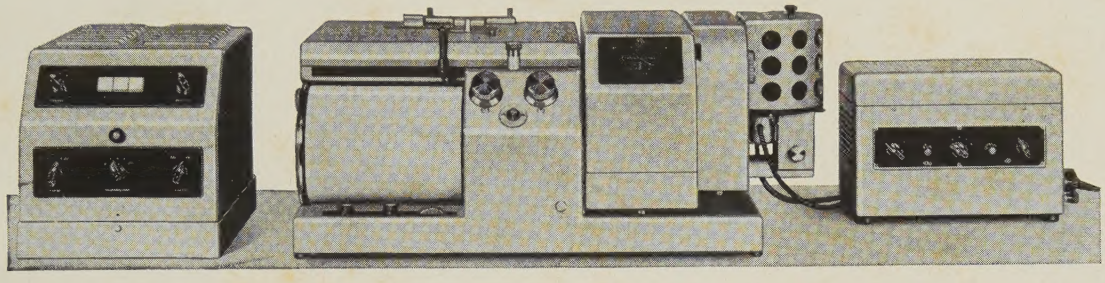
Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

ZEISS

Registrierendes Spektralphotometer RPQ 20A

Besondere Merkmale:

- Zweistrahlverfahren mit elektrischer Quotientenbildung. Strahlenteilung ohne bewegte optische Elemente.
- Wahlweise Registrierung von Transmissionsgrad, Extinktion (von 0 bis 1 oder 1 bis 2) und Intensität.
- Wellenlängenbereich von 200 mμ bis 2500 mμ.
- Zusatzgeräte für Remissionsmessung im Zweistrahlverfahren, für die Registrierung von Fluoreszenz- und Flammenspektren im Einstrahlverfahren.

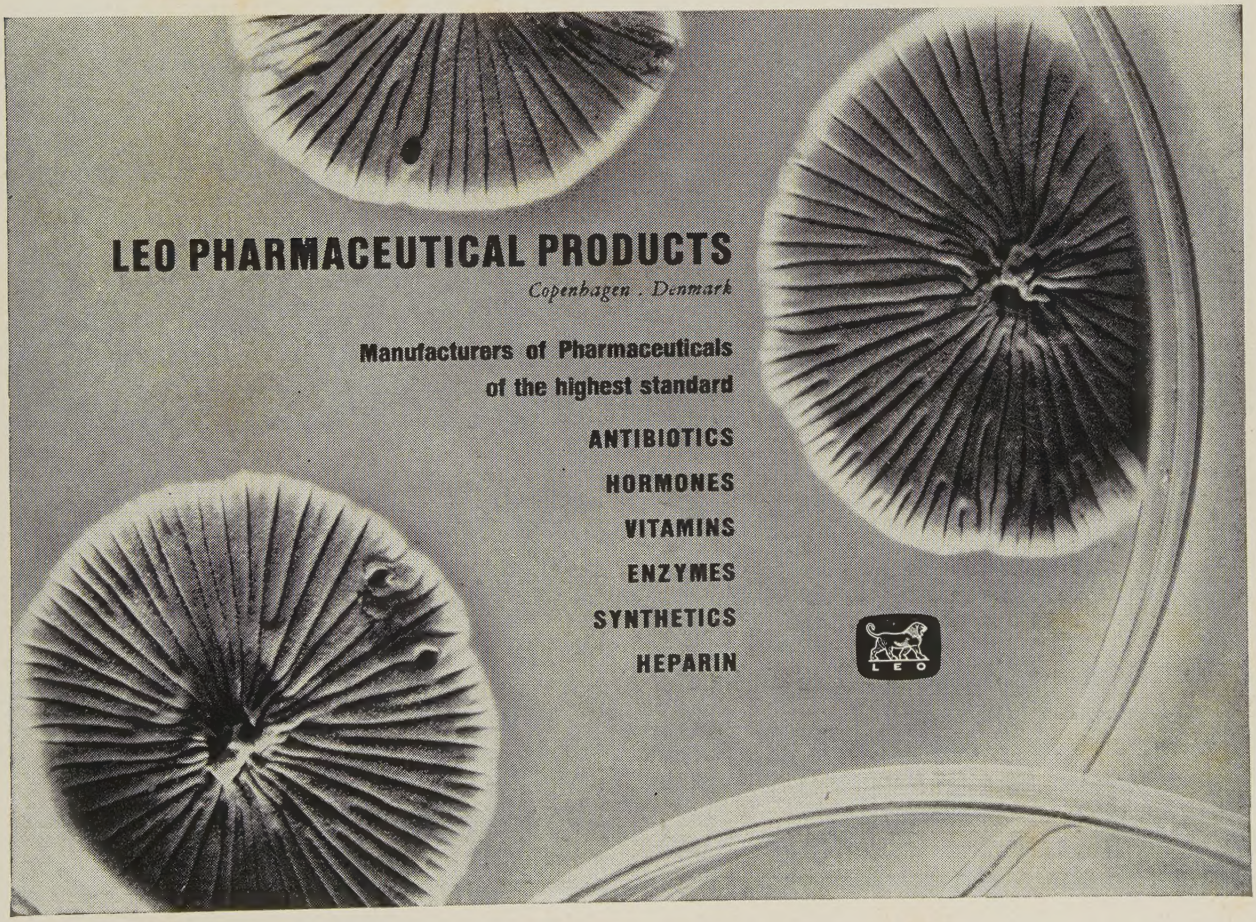


Bitte verlangen Sie den Prospekt Nr. 50-658/E

Znverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ *Optar* AG
ZÜRICH
Bahnhofstr. 40 Tel. (051) 23 97 73



*

Biochemica Roche

Für die wissenschaftliche Forschung stehen im Rahmen der **Biochemica «Roche»** über **300** Verbindungen aus den nachfolgend angeführten Substanzklassen zur Verfügung:

Aminosäuren	**neu eingeführt** DL-γ-Amino-β-hydroxy-buttersäure δ-Amino-lävulinsäure-hydrochlorid DL-Carnitinchlorid L(+)-α,γ-Diamino-buttersäure-monohydrochlorid D(–)-α,γ-Diamino-buttersäure-monohydrochlorid DL-o-Fluor-phenylalanin DL-m-Fluor-phenylalanin L(–)-Threonin D(+)-Threonin
Peptide	Glycyl-L-phenylalanin Glycyl-D-phenylalanin
Peptone und Proteine	
Alkanolamine, Alkylamine	
Heterocyclische Amine, Phenylalkylamine	
Zucker, Zuckeralkohole, Carbonsäuren	D(–)-2-Desoxy-ribose
Sterine, Gallensäuren, Gallenfarbstoffe, Carotinoide	β-Apo-8'-carotinal (C_{30}) β-Apo-8'-carotinsäure (C_{30})-methylester Canthaxanthin 7,7'-Dihydro-β-carotin
Herzglykoside	
Purine, Pyrimidinderivate, Pterine	

Vitamine und phosphorylierte Vitamine

Folgende Vitamine werden als Reinsubstanz abgegeben: Aneurin-phosphorestersäure-chlorid; (+)-Biotin; Folsäure; Nicotinsäure; Nicotinsäure-amid; Pantothensaures Calcium; Pantothensaures Natrium; Panthenol; Vitamin A-Alkohol crist.; Vitamin A-Acetat crist.; Vitamin A-Palmitat crist.; β-Carotin crist., synth.; Vitamin B_1; Cocarboxylase; Vitamin B_2; Lactoflavin-5'-phosphorestersaures Natrium; Vitamin B_6; Pyridoxamin-dihydrochlorid; Pyridoxal-5'-phosphat; Vitamin B_{12}; Vitamin C; Vitamin D_2; Vitamin D_3; Vitamin E; Vitamin E-Acetat; α-Tocopherol-phosphorestersaures Natrium; Vitamin K_1.

Antivitamine und Vitaminbausteine
Pflanzenwuchsstoffe
Krebserregende Substanzen
Hämatologie, Blutgerinnung
Reagenzien und Hilfsmittel
für biologische
und klinische Untersuchungen

Zustellung des
Biochemica-Kataloges mit
Preisliste durch

F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G., Basel

Biochemische Abteilung

59037

EXPERIENTIA

Vol. XV - Fasc. 7 Pag. 245–284 15. VII. 1959

Lignin and the Formation of Wood[1]

By F. F. NORD and W. J. SCHUBERT[2]

Wood is a natural product of plant origin. But, of course, not all plants produce wood, or are, as we shall say, woody. What then distinguishes woody plants from those which are not woody? The two types of plants can be distinguished from one another on the basis of four criteria:

(1)—Woody plants are perennial, i.e., they may live for many years, and in the case of some timber-producing trees, such as the giant redwoods or Sequoia of California, for 1000 years or more.

(2)—Woody plants possess a stem that persists from one year to the next. In the case of a tree, this stem is what we call the trunk.

(3)—Woody plants are said to be 'vascular', i.e., to possess a highly specialized conducting system consisting of a 'xylem' and a 'phloem'. The xylem is in fact the wood of the mature tree, while the phloem, on the other hand, is the bark.

(4)—A typical woody plant exhibits 'secondary thickening', i.e., a means of thickening its stem by prolonged growth in its diameter occurring over a period of years. This thickening is achieved as a result of the changes occurring within the growing layer of the plant, or 'cambium', which is situated in between the last formed layer of xylem (or wood) and the last formed phloem (or inner bark). This process then annually produces new wood in between the layer of the previous year's wood and the bark of the tree.

Precisely because it is one of the very few raw materials which is continuously being regenerated annually by nature, and in such tremendous quantities, wood is potentially one of the most important natural sources of organic chemicals for industry. Indeed, millions of tons of wood are cut every year in all parts of the world, but of all of this, only about 10% at the very most is used for chemical purposes.

Of that small amount of wood which is so exploited, some of it is converted by the pulp industry into wood cellulose, some by the industry of wood saccharification into simple sugars (which in turn may be fermented into ethyl alcohol or other products), and finally, a very small amount is utilized by the wood distilling industry. Of these three, only the last makes use of the total wood. The saccharification industry uses only the carbohydrate components of the wood, which amount to approximately 65% of its weight, whereas the pulp industry uses even less, namely, only the cellulose, which amounts to about 50% of the weight of the wood.

Early History of Wood Chemistry

For many decades, wood was considered to be a uniform chemical compound. However, with the advent of the techniques of experimental organic chemistry over one hundred years ago, chemists gradually succeeded in separating wood into its individual components. The first serious attempt to study the composition of woody plants was made in 1838 by a French chemist, ANSELME PAYEN[3]. He treated wood alternately with nitric acid and caustic soda and then with ethyl alcohol and ethyl ether, and as a result he obtained a substance which was quite resistant to the action of these reagents and solvents. PAYEN called this substance 'cellulose'.

In the process of his isolation of cellulose, PAYEN observed that it was necessary to remove another substance from the wood, which substance had a higher percentage of carbon than did the cellulose. He first referred to this other material as 'la matière ligneuse véritable' (or, the true wood material), but he later designated it as 'la matière incrustante' (or, the incrusting material), because of his belief that in woody plants the cellulose was surrounded or impregnated with this material. PAYEN also attempted to isolate this incrusting material as such, but he was not entirely successful. However, by modifying his method of extraction, he did obtain a series of preparations which contained varying ratios of cellulose and the incrusting material, and he called these preparations 'lignose', 'lignon', 'lignireose' and 'lignin'. It is this latter term, lignin (which comes from the Latin word for wood, 'lignum'), which was later adapted in 1857 by SCHULZE[4]

[1] Presented at the 4th International Congress of Biochemistry, Vienna 1958, in the Symposium *Biochemistry of Wood.*

[2] Department of Organic Chemistry and Enzymology, Fordham University, New York, Communication No. 356.

[3] A. PAYEN, Compt. Rend. *7*, 1052 (1838).

[4] F. SCHULZE, Chem. Centr. *28*, 321 (1857).

as the name for PAYEN's 'incrusting material', and this name has been retained and is still in use today.

As the result of a great deal of experimental work by many chemists over the years, the chemical properties of the cellulose portion of wood are quite thoroughly understood. Cellulose is an example of that group of carbohydrates known as the polysaccharides, and this signifies that it has a molecular size well above that of the average chemical compound. Only because of its tremendous size is it inconvenient to construct a structural formula for a complete cellulose molecule, but nevertheless, a small but representative portion of its structure may be illustrated as in Figure 1. Our knowledge of the chemical structure of the other principal component of wood, namely the lignin, has not kept pace with that of the cellulose, and as a result, it is still not possible to write with authority an equivalent structure for lignin.

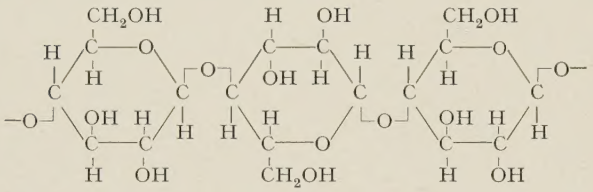


Fig. 1

Considering the tremendous amount of wood which goes to the pulp mills all over the world every day—in the U.S.A. alone, it averages over two billion cubic feet per year—and considering that about one-quarter of this is obtained as a lignin derivative of one form or another and is then discarded, it is not surprising that both the pulp and wood saccharification industries are constantly attempting to utilize this substance. While the latter has not yet found use for its waste lignin, except as a fuel, the pulp industry has had some success in applying a small part of its waste lignin in binders, adhesives, briquetting agents and synthetic rubber. A small amount of the lignin in sulfite waste liquor, furthermore, is converted into one high-grade chemical, namely vanillin, which is used as a synthetic flavoring agent.

The principal reason why a more complete utilization of lignin has not yet been achieved is precisely because our knowledge of its chemical structure is still so incomplete. Although over one hundred years have passed since its discovery by PAYEN, and although a tremendous amount of work has been done on this material, we still are unable to write a complete structural formula for this compound.

Due to our fragmentary knowledge of the structure of lignin, it is very difficult to define it. There is little doubt that lignin belongs to a class of compounds which are completely different from cellulose and the other polysaccharide carbohydrates. The portion of wood called 'lignin' can generally be separated from the other components only by particularly strong chemical reagents which undoubtedly have the effect of chemically modifying the lignin. This fact is one of the reasons why lignin preparations isolated by different methods vary so in their chemical compositions.

Furthermore, the term 'lignin' should not be regarded as the designation of one individual chemically defined compound, but rather, it should be thought of more as a collective term for a whole series of similar, very large compounds which are all closely related chemically to one another, perhaps in the same way as are certain other natural polymerization products, such as cellulose and starch, or perhaps even more closely, the proteins.

Unlike cellulose, lignin never occurs alone in nature, but it always seems to coexist with cellulose or some other carbohydrate. Although lignin appears to be physically associated with these carbohydrates, this does not imply that the lignin and carbohydrates form a chemical compound in wood, and indeed, it seems quite unlikely that this be the case.

As a result of the development of the wood-pulping industry, in which huge quantities of lignin are obtained as a by-product in the form of so-called 'sulfite' and 'black' liquors, it was natural that attempts be made to exploit this potentially valuable raw material. But such utilization requires a great deal of fundamental information on the chemical properties of the material, and so it was that in Sweden, around 1890, KLASON[5] (who is often referred to as the 'father of lignin chemistry') initiated the first intensive and extensive investigations of lignin by studying one of its common commercial by-products, namely, lignosulfonic acid.

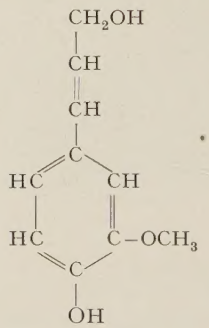


Fig. 2

Among the many contributions of KLASON to our knowledge of the chemistry of lignin, we may cite the following: he developed the first method for the quantitative determination of lignin in woody plants; he was the first to isolate lignin by applying sulfuric acid (a procedure which forms the basis for one method of lignin determination still in use today); he discovered

[5] P. KLASON, Svensk Kem. Tid. *9*, 135 (1897).

that if a simple alcohol, coniferyl alcohol (Figure 2), were treated under the same conditions as those used in the sulfite process of pulping wood, this alcohol was converted into a sulfonic acid possessing many properties which were very similar to those of lignosulfonic acid; but most important of all, KLASON was the first person to suggest that the parent structure of lignin might be a so-called 'phenyl-propane derivative of the coniferyl type' (Figure 3), a suggestion which is still widely accepted today.

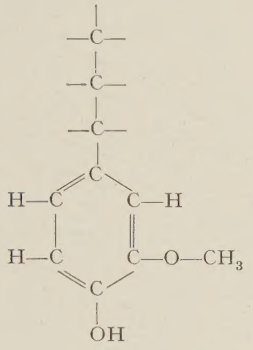


Fig. 3

The Isolation of Lignin

Much of the difficulty encountered by lignin chemists in their study of the chemistry of lignin can be traced to the fact that, for a long time, no method was known by which lignin could be isolated in its natural form. That is to say, no matter what method of isolation was attempted, the preparation obtained was not identical with the lignin as it had existed in the plant. The method of isolation itself had changed the lignin.

A solution to the problem of isolating lignin in its natural state therefore seemed to require a method of extraction from wood that would avoid the usual drastic treatments and instead employ some neutral, chemically inert solvent. The first chemist to be successful with this approach was BRAUNS[6], formerly of the Institute of Paper Chemistry at Appleton, Wis. In 1939, BRAUNS reported the extraction of some of the lignin from black spruce wood by thoroughly extracting very finely ground sawdust of this species with ethyl alcohol at room temperature[7]. This then became the first recorded isolation of a preparation which was identical with the lignin as it existed in the plant, and this was attributable to the extreme mildness of the conditions of the isolation. BRAUNS referred to his lignin as Native Black Spruce Lignin.

However, an important feature of BRAUNS' work was that he was able to isolate only 3% of the total content of the lignin of black spruce wood. The failure of the remaining 97% of the lignin present to be extracted by ethyl alcohol suggested either of two possibilities. (a) Perhaps the material which BRAUNS called Native Lignin was not really identical with the remainder of the lignin in the wood and happened to be more soluble in ethyl alcohol. Or perhaps, (b) the unextractable lignin was combined somehow with the cellulose of the wood, so that it was rendered less soluble in alcohol than that small amount of Native Lignin which presumably was not combined with the cellulose in any way whatever.

A resolution of this dilemma seemed to require a novel approach which would somehow avoid the many pitfalls of the previous experiments and yet permit a solution to this problem of the isolation of a natural lignin which would be identical with lignin *in situ*, or lignin as it exists in plants.

Ever since certain studies by FALCK[8], it is now quite generally agreed that in nature there are two different types of wood decay brought about by fungi. The two types are referred to as 'brown' and 'white' rots, and the difference between them is directly related to the chemical changes which the microorganisms effect on the chemical composition of the wood which is undergoing decay. In brown rot, the fungi[9] causing the rot selectively remove the carbohydrate components of the decaying wood, such carbohydrates as cellulose. But the lignin here remains completely unaffected, and the decaying wood gradually turns brown in color. On the other hand, in 'white' rot, the mold not only degrades the carbohydrates to a certain extent, but now, the lignin itself seems to be the main food supply of the organism. In decaying wood of this type, one can detect patches of a white substance which has been considered to be almost pure cellulose.

Some years ago, it occurred to the present authors that advantage might be taken of the selective ability of the 'brown rot' molds to remove the cellulose from wood, thereby presumably freeing additional amounts of the lignin present in association with it, for the purpose of eventually isolating greater amounts of chemically unchanged lignin from the partially decayed wood.

Briefly, the method of attacking this problem would be as follows. Sound uninfected wood would first be ground to a fine sawdust and subjected to sterilization, since even wood apparently free of decay might have present some cells or spores of wood-rotting fungi retained from its natural habitat. Then, under care-

[6] F. E. BRAUNS, J. Amer. chem. Soc. *61*, 2120 (1939).

[7] The *acetone* extract described by K. FREUDENBERG and L. KNOF (Chem. Ber. *90*, 2857 (1957)) as well as the unpurified *benzene*-alcohol extract used by ERDTMAN and LEOPOLD (Svensk Kem. Tid. *63*, 195 (1951)) are complex mixtures of several fractions and are not comparable with the electrophoretically homogeneous (W. J. SCHUBERT, A. PASSANNANTE, G. DE STEVENS, M. BIER, and F. F. NORD, J. Amer. chem. Soc. *75*, 1869 (1953)) native and enzymically liberated lignins.

[8] R. FALCK, Ber. dtsch. botan. Ges. *44*, 652 (1927).

[9] Some of which, e.g., *Trametes pini*, produce lignin-like substances themselves (W. Y. SCHUBERT and F. F. NORD, J. Amer. chem. Soc. *72*, 5337 (1950)).

fully controlled conditions, this sterilized sawdust would be inoculated with the cells of a pure culture of some specific wood-destroying organism which is known to produce 'brown rot' in wood. The progress of the decay of this wood by the mold could then be followed by periodic chemical analyses of the decaying sawdust. Since the organism used would be of the 'brown rot' type, the percentage of the cellulose in the wood should gradually diminish, while the percent of lignin should concomitantly increase. This gradual increase in the relative content of lignin and the gradual removal of the interfering cellulose should then have the effect of rendering the lignin more soluble in ethyl alcohol than it was before the fungal decay, and consequently, should allow the removal of greater amounts of lignin by extraction with this solvent.

This approach was first attempted in the authors' laboratories at Fordham University by subjecting two different species of softwoods (white Scots pine and white fir) to the decaying effects of four different species of 'brown rot' fungi.

Sound white Scots pine wood, before microbial decay, yields about 3·2% of its lignin as Native Lignin by thoroughly extracting the sawdust of this wood with ethyl alcohol. But in one experiment of the type described above, after decaying this species of wood by a brown rot mold *Poria vaillantii* for 15 months, 22·7% of the lignin[10] was isolated by the method of alcohol extraction

Since it is as a result of the action of highly specific biochemical catalysts, the enzymes, which are formed by the cells of the growing fungus and which selectively digest the carbohydrates of the wood, thereby rendering the lignin more accessible to dissolution in ethyl alcohol, the authors have referred to their lignin obtained in this way as Enzymically Liberated Lignin[11].

Enzymically Liberated Lignin

In view of the dilemma posed by the isolation of Brauns' Native Lignin, referred to previously, the authors were curious to learn whether their enzymically liberated lignin was the same as, or different from, native lignin. Accordingly, they isolated lignin from white Scots pine wood by both methods, and made an exhaustive comparison of the two preparations.

This comparison revealed that both the native and enzymically liberated lignins were soluble in solvents such as methyl and ethyl alcohols, in dioxane, pyridine, glacial acetic acid and dilute sodium hydroxide solution, but both were insoluble in water, ethyl ether, benzene and petroleum ether. Both lignins reduced Fehling's solution, and both gave the same colorations with such typical lignin color reagents as phenols and amines.

Furthermore, the identity of the two lignins also extended to their elementary compositions: both contained approximately 64% carbon, 6·3% hydrogen and 14·5% of methoxyl groups. This similarity extended to certain derivatives of the two lignins (the acetates and phenylhydrazones), and also to their ultraviolet and infra-red absorption spectra. Consequently, it was concluded that as far as could be determined, the native and enzymically liberated lignins of white Scots pine wood were certainly very similar[11].

The authors were then intrigued by the possibility that the lignin isolated from white Scots pine wood might represent a uniform, standard chemical entity which could be constant for many different species of softwoods.

Accordingly, a similar comparison was also made of the native and enzymically liberated lignins of another species of softwood, namely white fir. From the results of this comparison, it appeared that the two lignins of this species were also identical, and moreover, that both were also very similar to the lignins of the white Scots pine. Hence, it appeared that these lignins might very well be characteristic for several species of softwoods[11].

If the reader reflects upon the experiments previously described, he may reasonably come to the conclusion that these investigations do not permit the unequivocal statement that our enzymically liberated lignin did not consist to some extent of the native lignin which already existed in the sound wood prior to the fungal decay, for, because of its solubility in ethyl alcohol, the native lignin of the wood had to be present in the alcoholic extract of the decayed wood, together with the lignin liberated by the activities of the wood-rotting mold. A clear-cut separation of these two lignin fractions was therefore required before their identity could be unequivocally established.

It appeared to the authors that this ambiguity could easily be clarified by first extracting the sawdust of sound wood with ethyl alcohol very thoroughly until the native lignin was completely removed. This 'native lignin-free' wood could then be subjected to the rotting effects of a fungus, and, after a suitable period of decay, the wood residue could be re-extracted with ethyl alcohol. This extract then could of necessity contain only that lignin which was liberated from its association in the wood by the fungal decay, and would, of course, have to be completely free of native lignin.

The species of wood employed for this experiment was white Scots pine, and the 'brown rot' fungus employed to effect the decay was *Poria vaillantii*.

Accordingly, the native lignin was completely removed from a sample of sawdust of this species by thoroughly extracting it with ethyl alcohol until a color test on the extract revealed that further alcoholic

[10] The claim of B. Lehmann (in the discussion to our paper presented at the 4th Internat. Congress of Biochem. *2*, 205 (1959)) that our yields amount to 2–5% is misleading.

[11] W. J. Schubert and F. F. Nord, J. Amer. chem. Soc. *72*, 977 (1950).

extraction was removing no additional lignin. The native lignin-free wood was then subjected to decay by *P. vaillantii* for fifteen months. At the conclusion of this period, the decayed sawdust was then thoroughly re-extracted with ethyl alcohol at room temperature. As a result of the 'lignin enrichment' of the wood, the yield of alcohol-soluble lignin isolated from the *P. vaillantii* decayed white Scots pine wood increased from 3·2% to 22·7% of the total lignin. Thus, after a prolonged period of decay by a 'brown rot' wood-destroying mold, there was a substantial increase in the yield of alcohol-extractable lignin obtainable from decayed wood.

It was then of importance to determine whether this lignin, liberated from its association in the wood *exclusively* by the enzymic activity of the fungus, was really identical with, or different from, the native lignin from sound wood of this species. Consequently, another complete comparison was made of the lignin liberated from white Scots pine wood exclusively by *P. vaillantii*, with the native lignin of this species.

This comparison also involved the chemical compositions, solubilities, reducing ability, color reactions and ultraviolet and infra-red absorption spectra of the lignins, as well as a comparison of their acetate and phenylhydrazone derivatives. From the results of this comparison, it was concluded that the lignins liberated from the wood exclusively by the enzymic activity of the fungus and the native lignin of white Scots pine wood were indeed identical. It appeared, therefore, that the properties of the native lignin of white Scots pine wood are characteristic for the *total* lignin content of this species of wood[12].

In addition to the above experiments on the typical softwood, white Scots pine, similar investigations were also performed on the hardwoods[13], oak, birch and maple, on Japanese kiri wood, and on bagasse[14], which is the supporting fiber of the sugar cane plant. The analytical comparisons of these lignin preparations revealed certain divergencies among the lignins of the various species studied, but they also revealed the identity of the native lignin of any individual species with the enzymically liberated lignin of that same species[15].

Since the enzymically liberated lignins were found in all cases studied to be identical with the native lignins of the same species with regard to all their properties which could be compared, it now appears that all of the lignin of each species is a uniform chemical substance, or group of substances, the greater part of which, i.e., the 'extra-native' lignin, is associated with the cellulose in such a way as to make impossible, or at least very difficult, its extraction from the sound wood by inert solvents, such as ethyl alcohol[16].

[12] W. J. Schubert and F. F. Nord, J. Amer. chem. Soc. *72*, 3835 (1950).

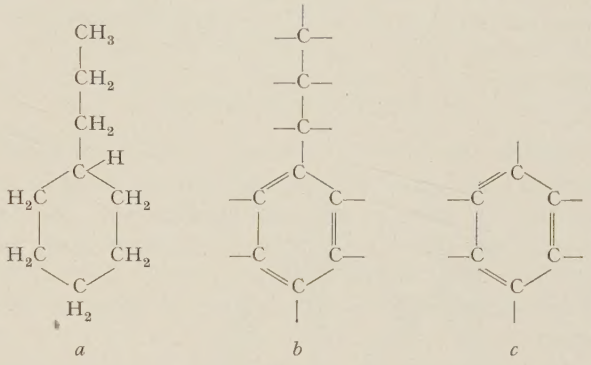
[13] S. F. Kudzin and F. F. Nord, J. Amer. chem. Soc. *73*, 690, 4619 (1951).

[14] G. de Stevens and F. F. Nord, J. Amer. chem. Soc. *73*, 4622 (1951); *74*, 3326 (1952); *75*, 305 (1953).

[15] F. F. Nord and W. J. Schubert, Holzforsch. *5*, 1 (1951).

The Nature of Lignin

It is really premature at the present time even to attempt to suggest a formula for lignin. However, on the basis of certain experimental results, it is possible to indicate certain structural features which a formula for lignin must accomodate.



a *b* *c*

Fig. 4

As a result of hydrogenation experiments on lignin, up to 50% of 'cyclohexyl-propane' type derivatives can be obtained (Figure 4a). This shows that a large part of the lignin structure is composed of 'phenyl-propane' type skeletons (Figure 4b), since there is no doubt that the cyclohexyl rings of the products resulted from the hydrogenation of benzene rings (Figure 4c) in lignin.

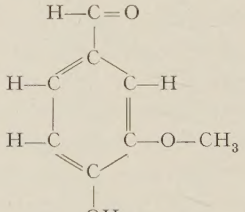


Fig. 5

That these benzene rings do occur in lignin is also indicated by its elementary analysis, which reveals a high degree of unsaturation (which is characteristic of compounds containing benzene rings) and also by the fact that on mild oxidation, up to 25% of an aromatic compound, vanillin (Figure 5), has been obtained. The formation of vanillin from lignin further indicates that, in at least a part of the lignin structure, these benzene rings contain methoxyl groups in the position of the ring *meta* to the three carbon side chain and a hydroxyl group in the position *para* to the three carbon side chain.

[16] W. J. Schubert, Holz als Roh- und Werkstoff *12*, 373 (1954).

Furthermore, there is little doubt that lignin is a high polymer which is formed to a great extent (perhaps entirely) by some kind of self-addition of these phenylpropane units. Just how these units are joined to one another, whether they are joined according to one single pattern, or in different ways, are all questions whose answers are still unknown.

Before a valid structural formula for lignin can be evolved, we must first know the structures of all the lignin 'building stones', and then we must characterize the 'building units', i.e., the dimerized and trimerized building stones, in order to learn the mode of combination of the building stones, one to another, with the sum total forming the very large lignin molecule.

How Lignin Is Formed

During the growth of woody plants, the carbohydrates are formed first. Then the formation of lignin begins, the process we call 'lignification'. In this process, the spaces in between the cellulose fibers are gradually filled in with lignin, or perhaps, some of the cellulose already present is converted somehow into lignin.

The purpose of this 'lignification' is really twofold. It cements and anchors the cellulose fibers together, and at the same time, it stiffens them and protects them from chemical and physical attack. Thus, the completely lignified fiber no longer plays an active role in the life of the plant, but it serves mainly as a supporting medium.

Although the complete picture of the chemical mechanism for the biogenesis of lignin is still unknown, there is little doubt that it originates ultimately from the carbohydrates which are formed first, from atmospheric carbon dioxide, by the process of photosynthesis. The 'lignification problem' then consists of the elucidation of the identity of the ultimate carbohydrate forerunner of lignin, together with an understanding of those enzymic mechanisms and intermediate compounds which are formed when this carbohydrate precursor is eventually transformed into the final product, namely, lignin.

With regard to the identity of the carbohydrate from which lignin may be ultimately derived, many suggestions have been advanced in the past as to its nature[17]. As the result of recent studies (F. F. NORD, W. J. SCHUBERT, and S. N. ACERBO (in press) 1959), employing the radioactive tracer technique, it has been established that it is the most common of all naturally occurring sugars, glucose.

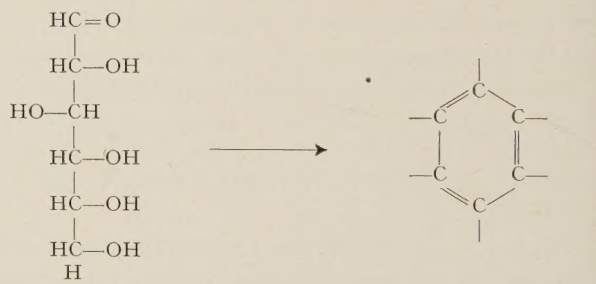
However, regardless of its identity, the carbohydrate forerunner must somehow be transformed into the very complex polymer, lignin. This cannot occur by a direct conversion, but must proceed by way of the continued self-addition, or polymerization, of some simpler, or monomeric, unit or units, which are referred to as the 'primary building stones' of lignin. The complete dissimilarity in chemical nature between carbohydrates, such as glucose, on the one hand, and an aromatic monomer on the other, implies an extended series of far-reaching enzymic reactions in order to effect this profound chemical change.

The complexity of the structure of lignin practically excludes the possibility of the existence of one simple 'building unit' for lignin in the sense in which glucose or cellobiose are considered the building units of cellulose. For lignin formation, it is necessary to postulate the existence of somewhat more complex, or 'dimeric secondary building stones'.

The formation of lignin itself finally may be either the direct condensation, or polymerization, of these secondary building stones as such, or else, there could conceivably be additional modifications before the final polymerization takes place, resulting in that very complex compound we call lignin.

Aromatization

Biochemists have long wondered about the mechanism by which plants are able to accomplish the quite remarkable feat of synthesizing 'benzenoid compounds' from non-benzenoid forerunners (Figure 6). The opportunity for an experimental approach to this problem arose from the isolation of certain very specialized strains of microorganisms which require a mixture of aromatic compounds in order to carry on their normal metabolic activities. Biochemical investigations have resulted in the elucidation of the following (incomplete) scheme (Figure 7) for the origin of two typical aromatic amino acids, phenylalanine and tyrosine[18].



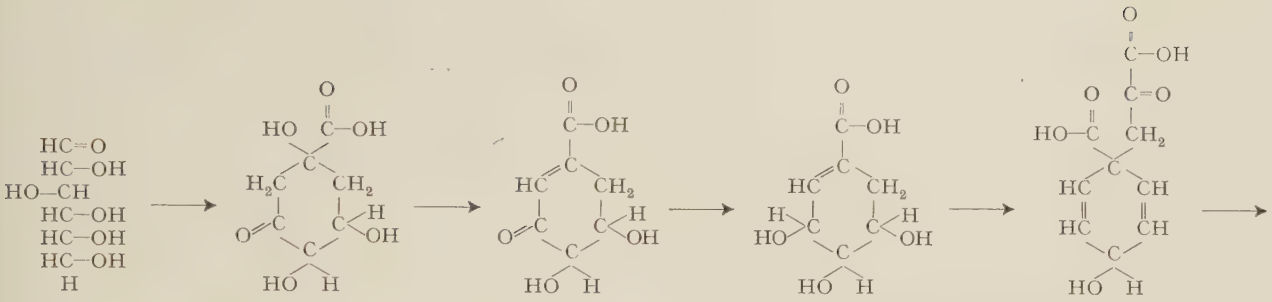
Glucose, a non-benzenoid precursor — A benzenoid product

Fig. 6

The probability of the origin of the aromatic plant polymer, lignin, from carbohydrate as its ultimate source then posed the intriguing possibility of a relationship between the scheme of aromatic amino acid biogenesis and lignification.

[17] F. F. NORD and J. C. VITUCCI, Adv. Enzymol. *8*, 253 (1948).

[18] B. D. DAVIS, Adv. Enzymol. *16*, 247 (1955).



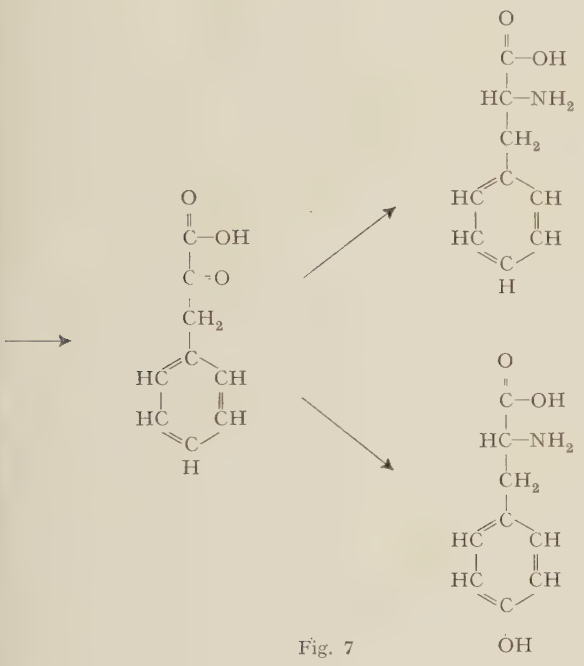


Fig. 7

Lignification in Sugar Cane Plants

Since the biochemical conversion of carbohydrates into aromatic amino acids proceeds by way of the intermediate formation of certain organic acids

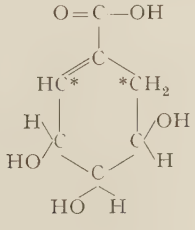


Fig. 8

(shikimic acid and p-hydroxyphenylpyruvic acid), it can be reasoned that these same acids might likewise play an important part in the lignification process as well. This has been demonstrated to be the case as the result of certain investigations utilizing the radioactive tracer technique in the authors' laboratories at Fordham University[19].

[19] G. Eberhardt and F. F. Nord, Arch. Biochem. Biophys. *55*, 578 (1955).

This was accomplished by first preparing samples of specifically labelled shikimic acid containing the radioactive isotope, carbon -14, in the two indicated positions, as in Figure 8.

This specifically labelled sample of shikimic acid was then 'force-fed' through the leaves of a growing sugar cane plant (Figure 9). Sugar cane plants, like trees, form much lignin.

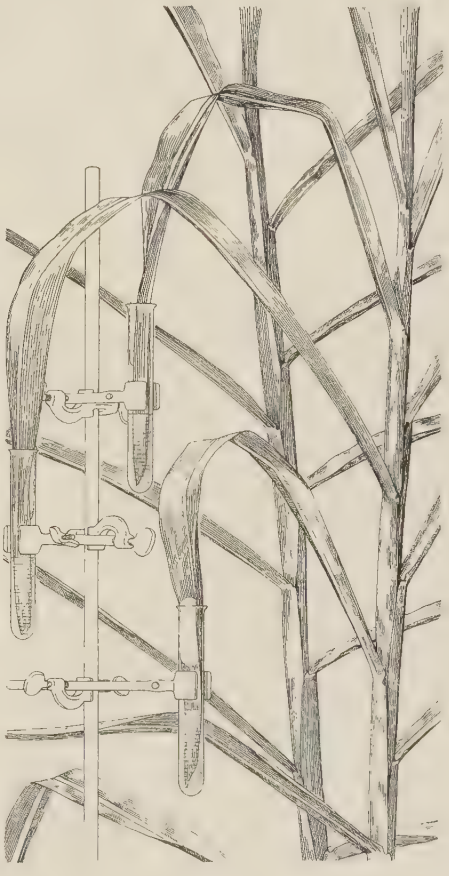


Fig. 9

After several days of this 'feeding', the plants were cut down and their lignin isolated by a standard method. This lignin was then treated with a mild oxidizing reagent and was thereby converted into vanillin (Figure 5). An examination of this vanillin revealed that it contained the radioactivity of the C^{14} which was originally contained in the 'fed' shikimic acid. This, of course, meant that the sugar cane plant had in fact converted the shikimic acid into lignin.

But even more important, it was possible to take this radioactive vanillin and degrade its aromatic ring in such a way as to selectively isolate the two carbon-atoms of the ring of this compound corresponding in their relative positions to the two 'tagged' positions of the original shikimic acid. An examination of these carbon atoms in the form of tribromopicrin (CBr_3NO_2), revealed that these two positions had indeed still retained the original radioactivity. This meant that the six-membered ring of shikimic acid was converted directly into the six-membered rings of the lignin polymer (as represented by vanillin) without any randomization of the carbon atoms[20].

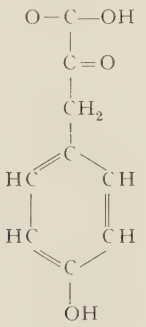


Fig. 10

This is excellent evidence for the fact that shikimic acid is an intermediate in the aromatization stage of the lignification process. That is, during the course of the conversion of carbohydrates into lignin by a sugar cane plant, shikimic acid is first formed, and then is consumed by further reactions of the process which result in the formation of lignin.

Similarly, it has also been demonstrated[21] at Fordham University that another acid, p-hydroxyphenylpyruvic acid (Figure 10), is likewise converted into lignin by the sugar cane plant, and hence, that this acid as well is to be regarded as one of the natural precursors of lignin, in the same sense as is shikimic acid. Of course, since it already is aromatic, p-hydroxyphenylpyruvic acid must be formed at a later stage in the lignification process than is shikimic acid, i.e., shikimic acid ultimately is converted into p-hydroxyphenylpyruvic acid, and not *vice versa*, before the latter is converted into lignin.

Lignin Building Stones

The use of the term 'lignin building stones' is based on the assumption that the lignin molecule, like cellulose and starch, is a long chain polymer composed of simple units which, in turn, are linked to one another in some way to form the next more complex pattern, or 'lignin building unit'. This concept is very similar to the use of 'glucose anhydride' (Figure 11a) as a building stone for cellulose and starch: the combination of two glucose anhydride groups can form either cellobiose (Figure 11b) which is the building unit of cellulose, or maltose (Figure 11c) which is the building unit of starch.

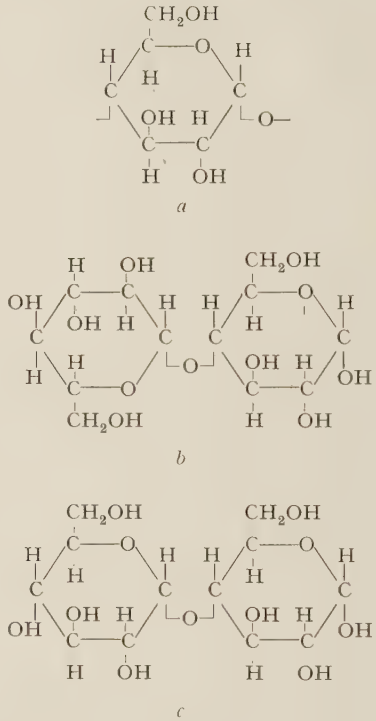


Fig. 11

The building stone of lignin possesses a phenylpropane carbon structure (Figure 4b), and *at least* four of these are linked together into a 'lignin building unit'. Then, a series of lignin building units, joined together, makes up the whole lignin molecule.

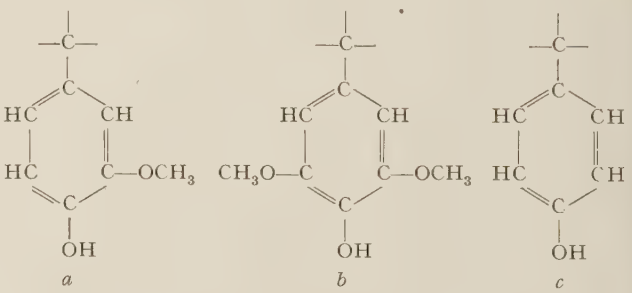


Fig. 12

Unlike the building stones of cellulose and starch which are uniform, lignin building stones, although having the same basic phenylpropane carbon structure, may be of at least three types, the vanillyl (Figure 12a), syringyl (Figure 12b), or p-hydroxyphenylmethyl (Figure 12c) structure.

[20] I. Eberhardt and W. J. Schubert, J. Amer. chem. Soc. *78*, 2835 (1956).

[21] W. J. Schubert, S. N. Acerbo, and F. F. Nord, J. Amer. chem. Soc. *79*, 251 (1957); Naturwiss. *44*, 35 (1957); J. Amer. chem. Soc. *80*, 1990 (1958).

Furthermore, intermediate between the most simple aromatic monomers and the final, highly complex, polymerized lignin, it is possible that some preliminary stage of lignification could occur. In this stage, a dimerization or trimerization has already occurred, and the final product, lignin, is formed as a result of an eventual polymerization of these intermediary 'secondary building stones'.

Our present knowledge of the process of lignification may then be expressed as follows: by the process of photosynthesis, the carbon dioxide of the atmosphere is converted by plants into glucose. The straight chain of carbon atoms of the sugar molecule is then cyclized into shikimic acid. This compound is then aromatized into compounds of the type of p-hydroxyphenylpyruvic acid. These latter compounds then become the first, or 'primary', lignin building stones. They then undergo dimerization, or other changes, and are thereby converted into the 'secondary' lignin building stones. These latter then eventually undergo the final polymerization which results in the enigmatic substance we call lignin[22].

Additional insight into the mechanism of lignification may be had from a study of the metabolism of a species of wood-destroying mold, namely, *Lentinus lepideus*. This fungus has the capacity to produce methyl p-methoxycinnamate from glucose-containing media[23]. The parallel between the two biochemical processes is apparent from the similarity of the structure of this aromatic ester with the structures of the lignin building stones[19,20]. Thus, the biogenesis of this ester has likewise been found to proceed by a pathway involving shikimic acid[24].

Recently, it has been found that methyl p-coumarate may be regarded as an intermediate in the metabolism of methyl p-methoxy cinnamate by *L. lepideus*, and also possibly in the biosynthesis of that compound[25]. It is therefore possible that, in the first step of the metabolism of methyl p-methoxycinnamate, this compound may be demethylated to methyl p-coumarate, and then, this latter compound may be further oxidized by a phenolase enzyme, possibly tyrosinase[26]. Such methylation and demethylation of phenolic compounds could have an important bearing on the mechanism of the biogenesis of lignin, and also on the metabolism of that substance by wood-destroying fungi.

Of course, this outline does not represent a complete scheme, since there are still some gaps in it which must be filled in. However, what is of transcendent importance is that now, finally, with the availability of present-day enzymological techniques, and even more recently, of the radioactive tracer technique, biochemists can now look forward with confidence to a complete clarification of the mechanism of this important natural process which occurs in certain plants and makes them 'woody', which process has mystified plant chemists now for over a century.

Zusammenfassung

Lignin kann in seiner ursprünglichen Form durch Abbau von Holz mit Hilfe von Zellulose-zerstörenden Pilzen und darauffolgender Extraktion mit kaltem Alkohol isoliert werden. Die Verbindung stellt enzymatisch freigesetztes Lignin dar. Im verholzenden Gewebe entsteht das Lignin aus photosynthetisch gebildeter Glukose über Shikimisäure und *p*-Hydroxyphenyl-Brenztraubensäure.

[22] W. J. Schubert and F. F. Nord, Adv. Enzymol. *18*, 349 (1957).
[23] F. F. Nord and J. C. Vitucci, Arch. Biochem. *14*, 243 (1947); *15*, 465 (1947).
[24] H. Shimazono, W. J. Schubert, and F. F. Nord, J. Amer. chem. Soc. *80*, 1992 (1958).
[25] H. Shimazono and F. F. Nord, Arch. Biochem. Biophys. *78*, 263 (1958).
[26] H. Shimazono, Arch. Biochem. Biophys. *83* (in press), 1959.

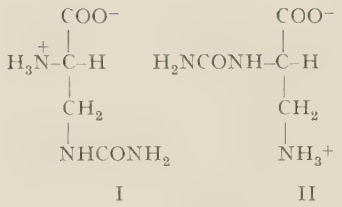
Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Structure of Albizziine [L(—)-2-Amino-3-ureidopropionic Acid], an Amino Acid from Higher Plants *(Mimosaceae)*

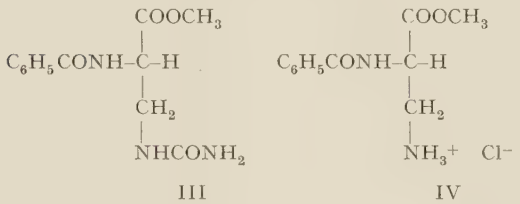
Albizziine is a new plant amino acid, recognized by Gmelin *et al.*[1] as a constituent of several species belonging to the family *Mimosaceae*. Its elementary composition, $C_4H_9N_3O_3$, infra-red spectrum and colour reactions with ninhydrin and Ehrlich's reagent[1], together with its degradation upon acid hydrolysis to carbon dioxide, ammonia and partially racemized L-2,3-diaminopropionic acid[2] strongly suggest the structure (I) or (II) for albizziine. Evidence is now available in this laboratory in support of the expression (I), which is formally analogous to L-citrulline.

[1] R. Gmelin, G. Strauss, and G. Hasenmaier, Z. Naturforsch. *13b*, 252 (1958).
[2] R. Gmelin, G. Strauss, and G. Hasenmaier, Hoppe-Seyler's Z. *314*, 28 (1959).



I II

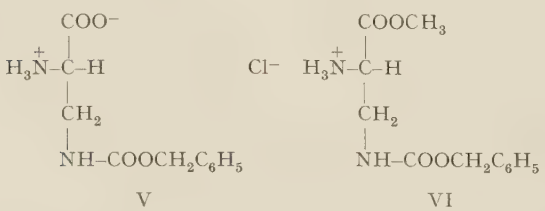
Upon benzoylation, albizziine[1,2] ($[\alpha]_D^{28}$: −67°C [c = 2·1 in H_2O]) afforded an oily N-benzoyl-derivative which was, in turn, esterified with diazomethane to yield the crystalline, *laevo*rotatory *N-benzoylalbizziine methyl ester* [m.p.[3] 171–174°C (from H_2O); Found: C 54·40; H 5·68; N 15·89. $C_{12}H_{15}N_3O_4$ requires C 54·33; H 5·70; N 15·84]. On critical comparison, this compound proved to be identical with a synthetic specimen of *methyl* L-*2-benzamido-3-ureidopropionate* (III) ($[\alpha]_D^{28}$: −32·5°C [c = 1·2 in CH_3OH]), prepared by reaction of methyl L-2-benzamido-3-aminopropionate hydrochloride[4] (IV) ($[\alpha]_D^{30}$: −48·3°C [c = 1·0 in CH_3OH][5]) with excess potassium cyanate in aqueous solution (pH 7) at 30°C.



III IV

The latter salt was synthesized according to Schneider[4], who further established its spatial relationship with the L-series by degradation to L-serine.

In course of the present studies, the albizziine-isomeride (II) was synthesized for comparison. L-2,3-Diaminopropionic acid hydrochloride ($[\alpha]_D^{24}$: +24·8°C [c = 4·7 in 1 N HCl]), isolated from seeds of *Mimosa Palmeri*[2], was treated with one equivalent of carbobenzoxy chloride in a phosphate buffer at pH 7 to give a 78% yield of a monosubstituted acid (V), separating from water in needles, m.p. 226–231°C (dec.) [Found: C 55·45; H 5·80; N 11·89. $C_{11}H_{14}N_2O_4$ requires C 55·45; H 5·92; N 11·76); ($[\alpha]_D^{21}$: −18·7°C (c = 1·0 in 1 N HCl), $[\alpha]_D^{18}$: −4·0°C (c = 1·1 in 0·1 N NaOH)]. The identity of the latter as L-*2-amino-3-carbobenzoxyamidopropionic acid* appeared from its transformation by means of diazomethane into a methyl ester hydrochloride, indistinguishable on basis of undepressed mixed melting point and coinciding infra-red spectra from an authentic sample of methyl L-2-amino-3-carbobenzoxyamidopropionate hydrochloride[4] ($[\alpha]_D^{21}$: −4·2°C [c = 2·1 in H_2O][5]).

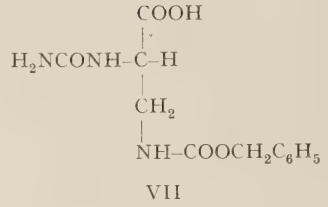


V VI

[3] Melting points are uncorrected and determined in an electrically heated block. Infra-red spectra (in KBr) have been determined of all the compounds discussed. Microanalyses were performed by Mr. P. Hansen at the Chemical Laboratory of the University of Copenhagen.

[4] F. Schneider, Liebigs Ann. *529*, 1 (1937).

[5] No rotation data have formerly been published.



VII

Upon reaction with potassium cyanate, the acid (V) was transformed into the corresponding L-*2-ureido-3-carbobenzoxyamidopropionic acid* (VII), m.p 188–190°C (dec.) (from H_2O) [Found: C 51·10; H 5·58; N 15·01. $C_{12}H_{15}N_3O_5$ requires C 51·24; H 5·38; N 14·94]; ($[\alpha]_D^{17}$: −1·5°C [c = 1·0 in 0·1 N NaOH]), which on hydrogenolysis with Pd-black afforded L-*2-ureido-3-aminopropionic acid* (II), separating from aqueous ethanol in colourless needles, m.p. 204–210°C (dec.) [Found: C 32·75; H 6·24; N 28·70. $C_4H_9N_3O_3$ requires C 32·65; H 6·17; N 28·56]; ($[\alpha]_D^{25}$: +3·2°C [c = 1·0 in H_2O], $[\alpha]_D^{25}$: −43·0°C [c = 1·0 in 0·1 N HCl], $[\alpha]_D^{27}$: +24·6°C [c = 1·0 in 0·1 N NaOH]). Like albizziine, the isomeride (II) produces normal colour reactions with Ehrlich's reagent and ninhydrin, but differs from the former in other respects, notably in its infra-red spectrum and rotatory data.

Further results in connexion with studies of the degradation and synthesis of albizziine will form the subject of a forthcoming communication elsewhere.

A. Kjær, P. Olesen Larsen, and R. Gmelin

Organic Chemical Laboratory of the Royal Veterinary and Agricultural College, Copenhagen (Denmark), March 12, 1959.

Zusammenfassung

Eine neue Aminosäure, Albizziin, wurde durch chemische Verknüpfung zwischen N-Benzoylalbizziinmethylester und L-2-Benzamido-3-ureidopropionsäuremethylester (III) als L-2-Amino-3-ureidopropionsäure (I) identifiziert. Die Synthese von L-2-Ureido-3-aminopropionsäure (II) wird beschrieben.

The Metabolism of 3-Hydroxytyramine-1-C^{14} in Brain Tissue Homogenates[1]

Recently it was reported that the distribution of 3-hydroxytyramine in the brain is different from that of norepinephrine[2]. This finding suggests that 3-hydroxytyramine may have an independent role in brain function in addition to being a precursor of norepinephrine. While we have previously reported the metabolites of 3-hydroxytyramine in rats urine[3], to our knowledge no data on the metabolites of this compound recovered from brain tissue has been reported. We, therefore, investigated the metabolism of 3-hydroxytyramine in brain homogenates by the following procedure:

Fresh cow brain obtained from the slaughter house was homogenized in a Waring blender with ice cold phosphor

[1] This study was supported in part by United States Public Health Service Grant M 2717.

The authors are grateful to R. J. Floody, M. D. of Hoffmann-La Roche Inc., for providing us with iproniazid.

[2] A. Bertler and E. Rosengren, Exper. *15*, 10 (1959).

[3] M. Goldstein, A. J. Friedhoff, and C. Simmons, Biochem. Biophys. Acta (in press).

buffer of the composition: Krebs-Ringer-phosphate solution pH 7·4, 10 mg of glucose, adenosine triphosphate and diphosphopyridine nucleotide (all at a concentration of $5 \times 10^{-4} M$) – (incubate *A*). To a second preparation of identical composition 50 mg of iproniazid was added (incubate *B*). To each preparation 0·2 mg of 3-hydroxytyramine 1-C^{14} was added and the mixtures were incubated for 3 h at 37°, using air as a gas phase. At the end of the incubation the homogenates were deproteinized with 10% meta phosphoric acid and centrifuged. The residues were washed twice with 10% meta phosphoric acid and the combined aqueous supernatants were extracted three times with ethyl acetate. The combined ethyl acetate extracts were concentrated to a small volume *in vacuo* under nitrogen and an aliquot was chromatographed in descending chloroform-acetic acid-water (2:1:1) system overnight. The run off was chromatographed in isopropylalcohol-ammonia-water (8:1:1) over a period of 12 h[3]. The dry chromatograms were then scanned in a calibrated counting chamber, so that it was possible to locate all radioactive zones. The chloroform-acetic acid-water chromatograms from both incubates showed one radioactive peak which had the same mobility as authentic 3,4-dihydroxyphenylacetic acid. The isopropylalcohol-ammonia-water chromatograms from both incubates showed no radioactive zones, thus indicating the absence of 3-methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid. The radioactive zone which had the same mobility as 3,4-dihydroxyphenylacetic acid was eluted with methylalcohol and rechromatographed in the following systems: (1) *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:1); (2) benzene-propionic acid-water (100:7:5). In each of those chromatograms, the mobility of the radioactive zone was identical with authentic 3,4-dihydroxyphenylacetic acid. At this point, 30 mg carrier of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid was added to the radioactive samples isolated from both incubates, and the samples were recrystallized from ethyl acetate-cyclohexane to constant specific radioactivity. The radioactivity in each stage of the purification of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid is listed in Table I.

The aqueous layers from both incubates were adjusted to pH 4 and acetylated in the same manner as described in a previous publication[4]. After extracting the acetylated amines into methylene chloride, the radioactivity in each of those extracts was determined. The percentage of the total radioactivity recovered in the acetylated fraction was 14% for incubate *A* and 19% for incubate *B*. The methylene chloride extracts were concentrated *in vacuo*, and aliquots were applied on the paper and chromatographed in the Bush «C» system[5]. The descending chromatograms were developed after 4 h. This technique provided a satisfactory separation of acetylated catecholamines and methoxy-catechol amines and their mobility is listed in Table II. The dry chromatograms were scanned in a calibrated counting chamber and from each incubate three radioactive peaks were isolated (Fig.). In peak No. 1 was found 3% of the total radioactivity of the acetylated fraction from incubate *A* and 5·5% from incubate *B*. Peak No. 1 has the same mobility in the Bush «C» solvent system as epinephrine triacetate, but as yet has not been identified. In peak No. 2 was found 6% of the total radioactivity of the acetylated fraction from incubate *A*, and 7% from incubate *B*. Peak No. 2 has the same mobility as 3-hydroxytyramine triacetate. Upon acid hydrolysis it was deacetylated, and after an addition of 0·1 mg nonradioactive 3-hydroxytyramine as a carrier and chromatography in *n*-butanol/*n*-HCl, the radioactivity was found to be associated with 3-hydroxytyramine. In peak No. 3 was found 5% of the

Table I

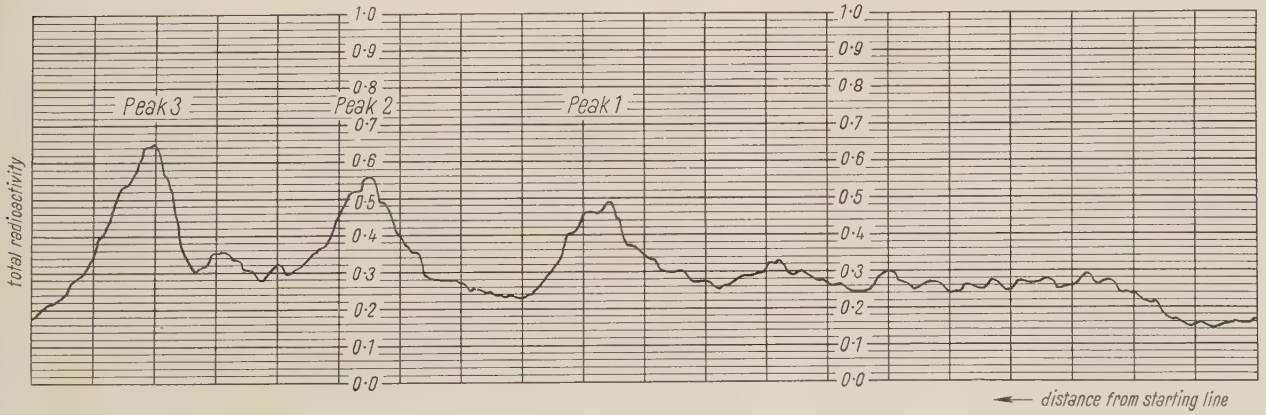
The radioactivity of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, isolated from cow brain incubates in various stages of purification

State of purification	Incubate «A»		Incubate «B»*	
	Total radio activity C.p.m.	Specific activity C.p.m./mg	Total radio activity C.p.m.	Specific activity C.p.m./mg
Paper Chromatography:				
Chloroform-acetic acid-water	127,000		123,500	
n-butanol-acetic acid-water	130,000		126,000	
benzene-propionic acid-water	119,500		122,000	
Crystallization:				
First	93,000	3,100	87,000	2,900
Second	86,500	2,900	83,000	2,750
Third	84,000	2,800	81,500	2,700

* The concentration of iproniazid was 100 mg/kg of brain tissue. This dosage provided inhibition of monamine oxidase *in vivo*.

[4] M. Goldstein, A. J. Friedhoff, and C. Simmons, Exper. *15*, 80 (1959).

[5] J. E. Bush, Biochem. J. *1951*, 370.



Paper chromatography separation of acetylated 3-hydroxytyramine-1-C^{14} and its amine metabolites in Bush chromatography 'C' solvent system.

Table II

The mobilities of catecholamine triacetate derivatives and methoxycatecholamine diacetate derivatives in Bush «C» chromatography system*

Acetate derivate of:	Distance from starting line in cm	Mobility in cm/h
Norepinephrine	7–9	2
Methoxynorepinephrine .	11–13	3
Epinephrine	18–20	4·75
Methoxyepinephrine . . .	20–22	5·25
3-hydroxytyramine . . .	23–25	6
3-methoxytyramine . . .	27–29	7

* Descending technique with Whatman No. 1 filter paper prewashed with benzene: methylalcohol (1:1) was used. The catecholamines were developed by passing a narrow strip through a solution of 1% $FeCl_3$ and 2% potassium-ferricyanide, blotting and then passing it through a solution of 10% KOH in methylalcohol:water (1:1). The methoxy catecholamines were developed by passing a narrow strip through a solution of 0·1% dichloroquinone chlorimide in alcohol, blotting and then passing it through a solution of 0·1 *M* borate buffer pH 10, blotting again and exposing the strip to ammonia vapors.

total radioactivity of the acetylated fraction from incubate *A* and 6·5% from incubate *B*. Peak No. 3 has the same mobility as 3-methoxytyramine diacetate. After addition of 0·1 mg nonradioactive 3-methoxytyramine diacetate and rechromatography in the Bush «C» solvent system, the radioactive zone was eluted and treated with acylase from hog kidney at 37°C for 3 h. This removed the O-acetyl group from 3-methoxytyramine diacetate. The removal of the O-Acetyl group was demonstrated by the development of an olive color upon treatment with dichloroquinone chlorimide in alcohol and borate buffer, pH 10. This reaction is specific for the free phenolic group. The N-acetyl 3-methoxytyramine was then chromatographed in *n*-butanol acetic acid-water solvent system, and the radioactivity was found to be associated with this compound.

The present investigation demonstrates that 3·4 dihydroxyphenylacetic acid is the main metabolite of 3-hydroxytyramine in brain tissue. Although our results are based on the metabolism of 3-hydroxytyramine in cow brain homogenates, a preliminary study of brain homogenates obtained from rats shows the same pattern. The small differences in the radioactivity of the amine fraction of incubates *A* and *B* indicate that iproniazid has no significant effect as a monamine oxidase inhibitor in whole brain tissue homogenates. The isolation of 3-methoxytyramine indicates that some O-methylation of the intact amine occurs. It is of interest that in urine of rats the main metabolite of 3-hydroxytyramine was found to be 3-methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid and not 3-4-dihydroxyphenylacetic acid[3]. These excretion studies demonstrate that 3-hydroxytyramine is metabolized by both O-methyl transferase and amine oxidase. However, from the present investigation it is evident that amine oxidase alone accounts for most of the metabolites of 3-hydroxytyramine in the brain.

Though the role of the corpus striatum in the etiology of Parkinson's disease is not completely understood, the presence of 3-hydroxytyramine in this area of the brain suggests that it may be related to this syndrome[2]. There are clinical reports[6], which indicate that reserpine can produce Parkinson like symptoms and reserpine is known to cause depletion of 3-hydroxytyramine from the brain[7]. This suggests that either the depletion of 3-hydroxytyramine or the activity of its metabolites may be related to Parkinson's syndrome. The possible relationship of the metabolites of 3-hydroxytyramine to Parkinson's disease is being investigated.

M. Goldstein, A. J. Friedhoff, C. Simmons, and N. N. Prochoroff

New York University College of Medicine, Department of Psychiatry and Neurology, Psychopharmacology Research Unit, New York, March 19, 1958.

Zusammenfassung

Homogenate aus Gehirn wurden mit 3-Hydroxytyramine-1-C^{14} inkubiert. Als Stoffwechselprodukt wurde aus der sauren Fraktion radioaktive 3,4-Dioxyphenylessigsäure isoliert. Aus der basischen Fraktion wurden drei radioaktive Zonen papierchromatographisch isoliert. Die erste Zone konnte noch nicht identifiziert werden. Die zweite wurde als 3-Hydroxytyramin und die dritte als 3-Methoxytyramin erkannt. Die mögliche Rolle der Stoffwechselprodukte von 3-Hydroxytyramin beim Parkinson-Syndrom wird diskutiert.

[6] S. Kline, *Clinical Applications of Reserpine*, in *Psychopharmacology* (éd. N. S. Kline, published by American Association for the Advance of Science, Washington, D. C. 1956), p. 81–108.

[7] A. Carlson, E. Rosengren, A. Bertler, and J. Nilsson, *Psychotropic Drugs* (Eds. S. Garattini and V. Ghetti, published by Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1957), p. 363.

Note added in Proof: Peak No. 1 has also been shown to have similar mobility as acetylated 3,4,5-trihydroxyphenylethylamine.

The Authors wish to thank Dr. S. Udenfriend, National Institute of Health, Bethesda, Md., for providing this compound.

Messung der Serum-Insulin-Aktivität mit epididymalem Ratten-Fettgewebe *in vitro*

Martin[1] beschrieb eine Bestimmungsmethode für Serum-Insulin-Aktivität mit epididymalem Fettgewebe *in vitro*, wobei die $C^{14}O_2$-Produktion aus 1-C^{14}-Glukose als Index für das vorhandene Insulin benützt wird. Aus unserem Labor berichtete Staub[2] über eine Nachweismethode für Insulin mit Hilfe der Glukoseaufnahme von epididymalem Rattenfettgewebe *in vitro*. Modifikationen seiner Technik erlauben es uns jetzt, die Serum-Insulin-Aktivität zuverlässig, konstant und relativ spezifisch zu messen.

Methodik. Als Versuchstiere dienten männliche Albinoratten (Spitalstamm), ernährt mit NAFAG-Rattenfutter und Wasser *ad libitum*, von einem Gewicht von 120–160 g.

Als Inkubationsmedium wurde Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer[3] verwendet, pH 7,4, mit Zusatz von 200 mg% Gelatine und 200 mg% Glukose. Die Pufferlösung wurde für jeden Versuch aus Stammlösungen frisch zubereitet.

[1] D. B. Martin, A. E. Renold und Y. M. Dagenais, Lancet *II/1958*, 76.

[2] M. Staub, Schweiz. med. Wschr. *88*, 831 (1958).

[3] W. W. Umbreit, R. H. Burris und J. F. Stauffer, *Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism* (Minneapolis 1945), p. 194.

Tabelle I

Glukoseaufnahme von epididymalem Rattenfettgewebe *in vitro* in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration

N	Insulin µE/ml	Glukose-aufnahme mg/g/h	*s*	% des Basal-wertes	*p*
12	0	0,70	± 0,18	100	
16	10	1,13	± 0,19	161	< 0,001
11	100	1,76	± 0,20	251	< 0,001
14	1000	2,38	± 0,20	340	< 0,001

Tabelle II

«Recoveries» von bekannten Insulinmengen, zugesetzt zu unbehandeltem Serum

Versuch Nr.	Insulin-Aktivität µE/ml	Insulin hinzugefügt	Insulin gefunden	% «reco-veries»
164	1400	1000	2300	96
168	20	500	470	90
169	16	500	640	124

Als Insulin stand uns mehrfach rekristallisiertes, glukagonfreies Schweine-Insulin Novo mit 23,9 I.E./mg (Fabrikangabe) zur Verfügung. Auflösung in 1/250 *n* HCl in einer Konzentration von 10 I.E./ml, anschliessende Verdünnung mit Puffer. Einmal gelöstes Insulin wurde während höchstens 3 Tagen verwendet.

Bestimmung der Glukose nach SOMOGYI-NELSON[4,5] oder mit der enzymatischen Methode der Firma C. F. Boehringer, Söhne, Mannheim.

Blutentnahmen erfolgten aus ungestauter Vene, ohne gerinnungshemmenden Zusatz. Abtrennung des Serums durch sofortiges Zentrifugieren. Untersuchung des Serums möglichst am gleichen Tag oder nach Aufbewahrung bei + 4°C.

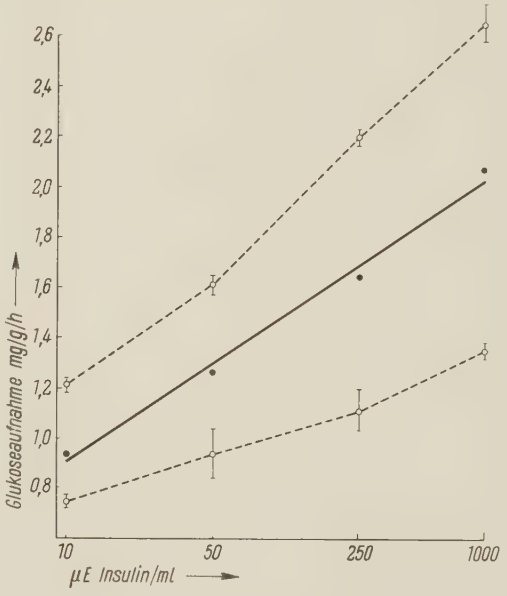
Für einen Versuch werden 4 während 24 h fastende Ratten von möglichst gleichem Alter und Gewicht benötigt. Die Tiere werden durch Schlag auf den Kopf und Ausbluten getötet und das Abdomen breit eröffnet. Die Testes werden, wenn nötig, durch leichten Druck ins Abdomen verlagert. Die beiden der Epididymis aufsitzenden Fettgewebszipfel werden etwas distal des gut sichtbaren epididymalen Blutgefässes mit der Schere abgetrennt. Jeder der beiden Zipfel wird in je 4 möglichst gleiche Teile zerschnitten und in 8 Inkubationsgefässe gebracht. Jedes der 8 Gefässe enthält so je 4 Fettgewebsstücke, von jeder Ratte eines, im Gesamtgewicht von etwa 100 mg. Das Gelingen des Versuches hängt von möglichst schonender Behandlung und gleichmässiger Verteilung der Fettgewebsstücke ab.

Als Inkubationsgefässe werden 10-ml-Ampullenfläschchen mit Gummistopfen verwendet, als Inkubationsmedien 0,7 ml folgender Lösungen: in Gefäss Nr. 1 + 2 Pufferlösung mit 10 µE Insulin/ml, in Nr. 3 + 4 Pufferlösung mit 1000 µE Insulin/ml, in Nr. 5–8 ein oder zwei zu testende Seren, deren Glukosekonzentrationen auf 200 mg% ergänzt wurden. Das Serum wird je nach der zu erwartenden Höhe der Insulinaktivität unverdünnt oder 1:10 verdünnt verwendet.

Die so mit den Fettgewebsstücken beschickten Inkubationsgefässe werden mit dem Gummistopfen verschlossen und durch eine Kanüle mit 95% O_2 und 5% CO_2 während 2 min durchströmt. Inkubation in einem Dubnoff-shaker bei 37,5°C, Schüttelfrequenz etwa 80/min, Inkubationsdauer 120–180 min. Nach der Inkubation wird das Gewebe auf Filterpapier leicht getrocknet und auf einer Torsionswaage gewogen. Berechnung der Glukoseaufnahme als mg Glukose/g Gewebe (Feuchtgewicht)/60 min. Die Glukoseaufnahme mit den beiden bekannten Insulinkonzentrationen ergibt für jeden Versuch eine eigene Eichkurve, an der die Insulinaktivität der beiden Seren abgelesen wird.

Alle Glaswaren wurden mit Haemosol (Fa. Meinecke und Co. Inc., New York) gewaschen.

Ergebnisse. Tabelle I zeigt die Durchschnittswerte der Glukoseaufnahme von epididymalem Fettgewebe in Abhängigkeit der vorhandenen Insulinkonzentration. Die kleinste mit Sicherheit nachweisbare Insulinkonzentration ist 10 µE/ml (Glukoseaufnahme 161% der Kontrollwerte, $p < 0{,}001$). Die Standardabweichung *s* des Mittelwertes ist gross, weil sowohl die basale Glukoseaufnahme als auch die Insulinempfindlichkeit des Fettgewebes von Versuch zu Versuch innerhalb weiter Grenzen schwankt.



Lineare Beziehung zwischen Glukoseaufnahme und log Insulinkonzentration im Bereich von 10–1000 µE/ml. Ausgezogene Linie = Durchschnittswerte von 5 Versuchen. Unterbrochene Linien = 2 typische Einzelversuche mit Doppelbestimmungen und Mittelwert.

Die Abbildung zeigt, dass die Beziehung zwischen Glukoseaufnahme und Logarithmus der Insulinkonzentration im Bereich zwischen 10–1000 µE/ml linear ist. Gleichzeitig sind zwei einzelne Versuche aufgezeichnet, um die Variation der Glukoseaufnahme von Versuch zu Versuch zu veranschaulichen. Die Höhe der basalen Glukoseaufnahme (ohne Insulin) wird weitgehend durch den Ernährungszustand der Ratten bestimmt. Je länger die Fastenperiode, desto niedriger die basale Glukoseaufnahme. Die Neigung der Kurve, das heisst die Insulinempfindlichkeit, wird wesentlich durch die Grösse der Fettgewebszipfel bestimmt: je grösser sie sind, desto geringer die Insulinempfindlichkeit. Offenbar spielen sich die Stoffwechselvorgänge des *in vitro* inkubierten Fettgewebsstückes vor allem an seiner Oberfläche ab[6].

[4] M. SOMOGYI, J. biol. Chem. *160*, 69 (1945).
[5] N. NELSON, J. biol. Chem. *153*, 375 (1944).
[6] P. BALLY, persönliche Mitteilung.

Tabelle III

Einfluss von Adrenalin auf die Insulinwirkung am epididymalen Fettgewebe

N	Adrenalin γ/ml	Insulin μE/ml	Glukoseaufnahme mg/g/h	$\bar{d}$	s*	t	p
12 12	0 0,01	0–10 000	1,505 1,630	+0,125	± 0,26	1,67	> 0,1

* $s = \sqrt{\frac{\sum (d - \bar{d})^2}{N \quad 1}}$, t $d \sqrt{N}$. s

Die Insulinaktivität im Serum gesunder Kontrollpersonen betrug 20–800 μE/ml (eine Zusammenstellung der gefundenen Serum-Insulin-Aktivitäten bei Gesunden und endokrin Erkrankten ist einer späteren Publikation vorbehalten). Die Linearität der Beziehung zwischen Glukoseaufnahme und Insulinkonzentration *in vitro* liegt demnach im Bereich der physiologischen Insulinkonzentration im Serum.

Um zu zeigen, dass für die Förderung der Glukoseaufnahme durch Serum wirklich dessen Insulingehalt verantwortlich ist, wurde das Serum mit Zystein inkubiert[7], worauf keine Insulinaktivität mehr festgestellt werden konnte (vor Zystein: 20 μE/ml, nach Zystein: 0 μE/ml), bzw. auf sehr geringe Werte absank (vor Zystein: 5000 μE/ml, nach Zystein: 15 μE/ml).

Ferner wurden bekannte Mengen Insulin einem Serum zugesetzt und die «recoveries» bestimmt. Diese betrugen im Durchschnitt 104% (Tab. II).

Verdünnung des Serums (1:10) hat keinen Einfluss auf seine Insulinaktivität.

(Serum 1 unverd.: 350 μE/ml, 1:10 verd.: 34 μE/ml;
Serum 2 unverd.: 44 μE/ml, 1:10 verd.: 5,3 μE/ml).

Adrenalin in einer Konzentration von 10^{-2} γ/ml ist ohne Einfluss auf die Insulinwirkung *in vitro* (Tab. III) (physiologische Konzentration von Adrenalin + Noradrenalin im menschlichen Blut höchstens 4×10^{-3} γ/ml[8]).

Diskussion. Randle[9] hat kürzlich die gesamte Problematik der biologischen Insulin-Bestimmungsmethoden aufgerollt. Eine wesentliche methodische Verbesserung scheint uns durch die Verwendung von epididymalem Fettgewebe anstelle von Zwerchfellmuskel als Testgewebe gegeben. Da das Fettgewebe ohne Nachteile in mehrere Stücke zerlegt werden kann, wird der Vergleich von Standard-Insulinlösungen und Unbekannten am Gewebe des gleichen Tieres möglich[1,2]. Dies ist deshalb wichtig, weil die basale Glukoseaufnahme und die Insulinempfindlichkeit der Gewebe verschiedener Ratten erheblich voneinander abweichen können, auch wenn die Tiere in Rasse und Gewicht übereinstimmen.

Ferner scheint Fettgewebe den aktiveren Glukosestoffwechsel als Muskulatur – bezogen auf den N-Gehalt – zu haben und insulinempfindlicher zu sein[10]. Insulin ist für die vor allem im Fettgewebe stattfindende Fettsynthese unerlässlich[11], so dass dieses Gewebe auch vom physiologischen Standpunkt aus für eine Insulin-Bestimmungsmethode geeignet erscheint. Die Insulinwirkung auf das Muskelgewebe ist in vielen Belangen unspezifischer; so wird zum Beispiel die Glukoseaufnahme auch durch Muskelarbeit wesentlich gefördert.

Ein weiterer Vorteil des Fettgewebes ist die Unbeeinflussbarkeit der Glukoseaufnahme durch Adrenalin, das bei der Zwerchfellmethode stören soll[12].

«Recoveries» von 104%, die fast vollständige Inaktivierung der Serum-Insulin-Aktivität durch Zystein und die Unbeeinflussbarkeit durch Adrenalin sprechen für eine weitgehende Spezifität der in diesen Versuchen verwendeten Fettgewebsmethode. Inwieweit andere Hormone, wie STH, Glukagon oder Cortison interferieren können, soll erst noch überprüft werden.

Auch die Frage der Insulin-Antikörper, die ein zu niedriges Serum-Insulin vortäuschen könnten[13,14], wurde bis jetzt nicht überprüft.

Es scheint somit weiterhin angezeigt, von Insulin-Aktivität (insulin-like activity) und nicht von Serum-Insulin schlechthin zu sprechen[1,9].

R. E. Humbel

Medizinische Klinik der Universität Zürich, 16. März 1959.

Summary

A modified technique for the estimation of insulin-like activity of serum, using the glucose-uptake of isolated rat epididymal fat tissue is described. The method seems to be reliable, accurate, relatively specific and – in our hands – superior to the diaphragm method.

[7] E. W. Sutherland und C. F. Cori, J. biol. Chem. *172*, 737 (1948).

[8] J. Kägi und H. Langemann, Schweiz. med. Wschr. *85*, 402 (1955).

[9] P. J. Randle, Ciba Fdt. Coll. Endocrin. *11*, 115 (London 1957).

[10] A. E. Renold, A. I. Winegrad und D. B. Martin, Helv. med. Acta *24*, 322 (1957).

[11] A. I. Winegrad und A. E. Renold, J. biol. Chem. *233*, 267 (1958).

[12] J. Groen, A. F. Willebrands, H. G. van der Geld und R. E. Bolinger, Ciba Fdt. Coll. Endocrin. *12*, 255 (London 1958).

[13] J. Bornstein, J. biol. Chem. *205*, 513 (1953).

[14] J. Vallance-Owen, B. Hurlock und N. W. Please, Lancet *II/1955*, 583.

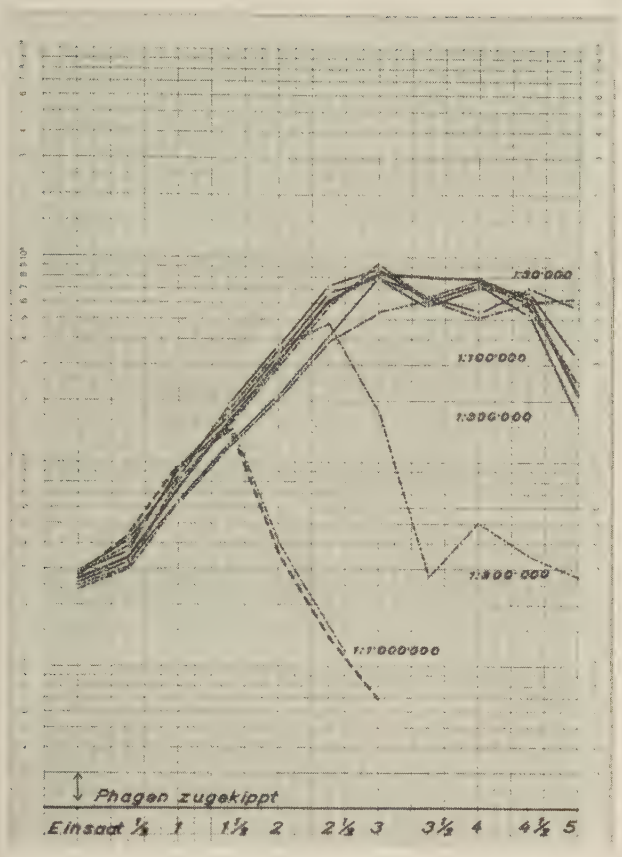
Relations du «métabolisme respiratoire» des bactéries et du type de bactériophage avec l'activité de substances antiphages

Ayant mis en évidence la différence d'attaque[1] des bactériophages de la série T, différence qui permet de subdiviser ceux-ci en deux groupes selon la lyse provoquée, nous avons étudié l'action de substances antiphages sur le cours du métabolisme respiratoire de l'ensemble (bactérie-bactériophage) afin de déceler une éventuelle différence d'action entre des types T de caractère différent tels T_1 et T_2. Nous avons utilisé la méthode de Warburg précédemment décrite[2] en la considérant en même temps comme un test quantitatif de démonstration de la spécificité et du caractère de l'action antiphage. Parmi nos substances antiphages, nous avons choisi le dérivé 9238, c'est-à-dire: Tetra-chlorhydrate de bis-*p,p'*-[4-*β*-(diéthylamino-éthylamino)-7-méthoxy-quinazolyl-(2)-amino]-diphénylsulfone.

Cette substance possède une «zone d'action» relativement large, c'est-à-dire qu'elle inhibe encore le bactériophage T_1 à une dose environ dix fois plus faible que la dose bactériostatique de sa souche sensible. L'inhibition du

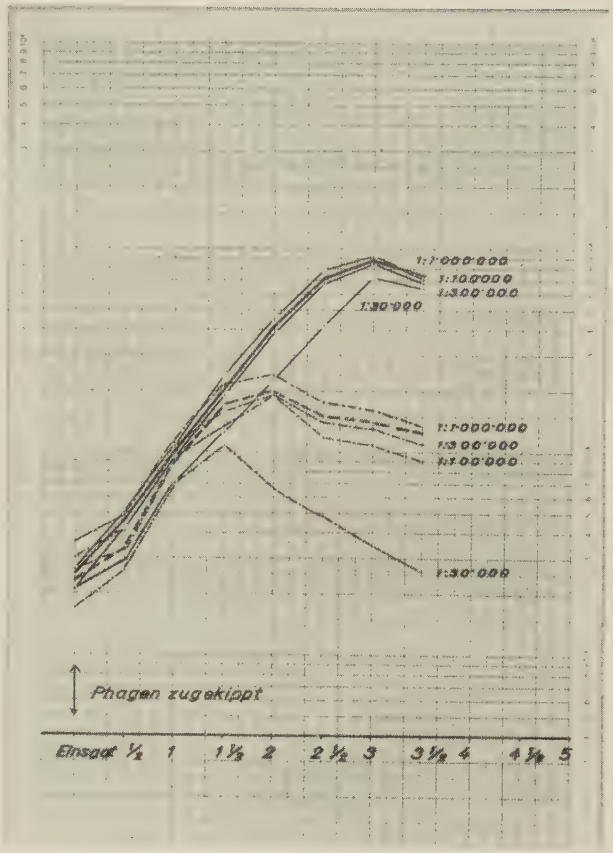
[1] R. Meier, L. Neipp et W. Kunz, Schweiz. med. Wschr. *87*, 1427 (1957). – L. Neipp, W. Kunz et R. Meier, Exper. *13*, 74 (1957).

[2] L. Neipp, W. Kunz et R. Meier, Schweiz. Z. Path. Bakt. *19*, 331 (1956).



Courbes 1. Subst. 9238 + *E. coli* Delbrückii + phages T_1 (10^{-12}) en bouillon Difco 6%.

E. coli Delbr. (Contrôle) ———; Bactériophages (Contrôle) – – –; Bactéries + subst. 9238 — · — ·; Bactéries + 9238 + phages ·· ·· ·· ·.



Courbes 2. Subst. 9238 + *E. coli* Delbrückii + phages T_2 (10^{-2}) en bouillon Difco 6%.

E. coli Delbr. (Contrôle) ———; Bactériophages (Contrôle) – – –; Bactéries + subst. 9238 — · — ·; Bactéries + 9238 + phages ·· ·· ·· ·.

bactériophage se produit à des concentrations qui ne semblent avoir aucune activité «visible», ni sur la respiration bactérienne, ni sur la vitesse de multiplication.

Entre la concentration qui inhibe complètement la bactériolyse et celles qui sont inactives, se situent celles qui ralentissent son apparition sans changer quoi que ce soit à son cours (par exemple 1:300000).

Ce mode d'activité ressemble beaucoup à l'action de la même substance sur *Esch. coli* 207[2]. Une différence cependant est à mentionner: l'amplitude de la zone d'action est un peu plus grande pour ce dernier germe, ce qui provient d'une sensibilité moins grande de la souche sensible d'*Esch. coli* 207 au dérivé 9238.

Cette substance possède également un type et une zone d'action très voisins de ceux de la substance 15858/E (tetrachlorhydrate-tetrahydrate de *bis*-[[4-[4-(3-diéthylamino-propylamino)-6-méthyl-2-pyrimidyl-amino]-phényl]]-sulfone), une zone sans activité bactériostatique mais avec une complète action «phagostatique»[2].

Particulièrement intéressant était d'analyser l'influence de 9238 sur un bactériophage du groupe $T_2\,T_4\,T_6$, en l'occurrence le bactériophage T_2.

Les résultats et les courbes ci-dessus montrent qu'avec des concentrations non bactériostatiques de 9238, il n'a pas été possible d'obtenir la moindre action inhibitrice du bactériophage T_2. Les courbes sont analogues à celles obtenues en considérant seulement l'action du bactériophage T_2 sur sa souche sensible.

Même en faisant varier certains facteurs comme la quantité de bactériophages ensemencés, le moment de la mise en contact avec les bactéries sensibles, la composition du bouillon employé etc., expériences dont nous publierons les résultats ultérieurement, il n'a pas été possible d'observer la moindre action.

Il est pour le moins curieux que les bactériophages du groupe $T_{2,4,6}$ qui semblent posséder une action plus faible ou plus lente vis-à-vis de leur souche sensible, paraissent bien plus résistants à des substances inhibitrices de bactériophages «très voisins» et à activité lytique très prononcée.

D'autre part, cette action lytique particulière des bactériophages $T_2\,T_4\,T_6$ ressemble à celle obtenue lors de l'ensemencement d'une quantité insuffisante de phages appartenant à l'autre groupe.

Conclusions. Nos précédents essais *in vitro* (spécificité d'action) sont confirmés par l'emploi du test plus précis qu'est la méthode de Warburg (mesure quantitative du métabolisme respiratoire).

En ce qui concerne l'action de substances «antiphages», telles 9238 et 15858/E, sur l'activité de bactériophages doués d'un mécanisme d'action différent (soit T_1 et T_2), c'est-à-dire sur l'inhibition de la bactériolyse, les essais antérieurs sont confirmés. D'une part, la «respiration» reprend un cours d'apparence normal par suite de l'inhibition de l'action du bactériophage T_1 (premier groupe); d'autre part, il n'a pu être enregistré aucune action de ce genre avec le bactériophage T_2 (deuxième groupe) comme nous l'avons précédemment rapporté pour *Esch. coli* 207.

Des résultats récents montrent que des phénomènes analogues ont été observés avec les autres bactériophages

du premier groupe: T_3, T_5 et T_7 bien qu'avec certaines petites différences pour T_7, ainsi qu'avec les deux autres bactériophages T_4 et T_6 appartenant au deuxième groupe.

Ceci démontre une fois de plus la présence d'une spécificité de l'action antiphage des substances synthétiques dans des conditions d'expériences bien définies. Cette spécificité pourrait être due à la présence d'un facteur spécial soit dans la bactérie ou dans le bactériophage, soit dans le milieu extérieur.

L. Neipp, W. Kunz et R. Meier

Laboratoires de Recherche du Département pharmaceutique de CIBA Société Anonyme, Bâle (Suisse), le 24 avril 1959.

Summary

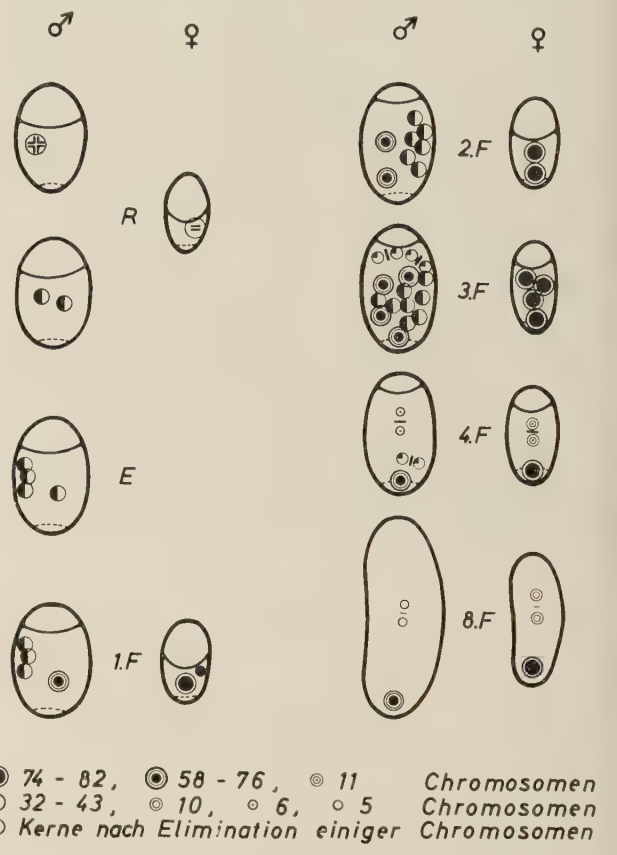
Quantitative determination of bacteriolysis with different T_{1-7}-phages confirms earlier observations that with substances inhibiting the action of T_1-phage the normal respiratory metabolism of the protected bacteria is quantitatively restored in every detail.

With T_2-phage, showing a different respiratory course of bacteriolysis, no effect is obtained with the same substance, either on the respiration of the bacteria or on the typical course of respiration during bacteriolysis. The action of the phage inhibiting substance against T_1-phage is therefore an effect of definite specificity.

Über die Zytologie der Parthenogenese und der Geschlechtsbestimmung bei der Gallmücke *Oligarces paradoxus* Mein.

Die Gallmücke *Oligarces paradoxus* Mein. besitzt einen heterogonen Generationswechsel, dessen Verlauf Ulrich[1] abklärte. Die parthenogenetische Vermehrung erfolgt bereits auf dem Larvenstadium. Diese Form der Parthenogenese wird als Pädogenese bezeichnet. Je nach gebotenen Kulturbedingungen entwickeln sich die Eier in einer weiblichen Larve pädogenetisch zu ♀♀, zu ♂♂ oder zu ♀♀ und ♂♂ nebeneinander[1]. Obwohl somit Umweltfaktoren für die Geschlechtsbestimmung bei *Oligarces* verantwortlich sind, durften wir geschlechtsverschiedene Chromosomenvorgänge in frühen Entwicklungsstadien erwarten. Einen Hinweis gaben die Untersuchungen von White[2] an *Miastor*, einer anderen pädogenetischen Gallmücke, deren Somazellen beim ♀ 12, beim ♂ 6 Chromosomen enthalten. Eireifung und die ersten Furchungsteilungen der pädogenetisch entstehenden ♀♀ von *Oligarces paradoxus* Mein. hat Reitberger[3] an Schnittpräparaten sehr genau analysiert. Das Studium entsprechender Entwicklungsstadien der ♂♂ war bisher an Zuchtschwierigkeiten gescheitert. Nachdem wir eine Methode entwickelt hatten, die ♂♂ in genügender Zahl lieferte, konnten wir den chromosomalen Vergleich von ♀♀ und ♂♂ angehen. Wir stellten von Eiern und jungen Embryonen orcein-gefärbte Total- und Quetschpräparate her.

Die Eier sind in Ei- und Nährkammer gegliedert. Am Eipol gegenüber der Nährkammer hebt sich das intensiver färbbare Polplasma vom übrigen Eiplasma ab. Wenn eine pädogenetisch entstandene weibliche Larve aus der abgestorbenen Mutterlarve schlüpft, liegen die Eier noch ungereift im Ovar, und aus Zuchtversuchen geht hervor, dass ihr Geschlecht noch nicht determiniert ist. Kurz bevor die Eireifung einsetzt, ist ein erster Geschlechtsunterschied erkennbar: die ♀-Eier sind kleiner als die ♂-Eier, und bei letzteren hat sich im Zuge der Volumenzunahme das Grössenverhältnis von Ei- und Nährkammer zugunsten der Eikammer verschoben. ♀♀- und ♂♂-Eier durchlaufen Stadien einer Chromosomenpaarung. Beim ♀-Ei trennen sich jedoch die Partner vorzeitig, und es findet nur eine Reifeteilung statt. Diese ist äquationell und ergibt zwei unreduzierte Kerne: einen Richtungskern nahe der Eioberfläche und einen primären Furchungskern im Eiinnern. Der Richtungskern degeneriert in der Regel.



Schema der chromosomalen Vorgänge bei der pädogenetischen Entwicklung von *Oligarces paradoxus*.

Sämtliche Kerne befinden sich in Metaphase. (*R*) Reifeteilung, (*E*) Endomitose, (*F*) Furchungsteilung. Das Kreuz (Tetrade) im männlichen Eikern gibt Reduktion, der Doppelstrich im weiblichen Eikern äquationelle Teilung an. Die Chromosomenzahl des männlichen und weiblichen Eikerns liegt zwischen 74 und 82. Der total schwarz ausgefüllte Kern im ♀ der 1. Furchungsteilung stellt den degenerierenden Richtungskern dar. Die einfachen Striche zwischen Kernen der 3., 4. und 8. Furchungsteilung bedeuten eliminierte Chromosomen. In der 4. und 8. Furchungsteilung sind von jedem somatischen Kerntyp nur noch zwei Tochterkerne eingezeichnet, und es ist nur je ein Keimbahnkern dargestellt. Vergrösserung der Eier etwa 115fach.

Beim ♂-Ei dagegen bleibt die Chromosomenpaarung erhalten. Zwei Reifeteilungen laufen ab, die zu vier reduzierten Kernen führen: drei Richtungskerne nahe der Eioberfläche und ein primärer Furchungskern in der Eimitte.

Während beim ♀ erwartungsgemäss an die Reifeteilung unmittelbar die erste Furchungsteilung anschliesst, verhalten sich die Kerne im ♂ abweichend, nämlich folgendermassen: Nach der Meiose setzen alle vier Kerne zu einer Teilung an. Die drei Richtungskerne erreichen ein der Prophase ähnliches Stadium und gehen ungeteilt wieder in Ruhekerne über. Der Kern in der Eimitte, der primäre Furchungskern, wurde in Prophase nicht gesehen, wohl

[1] H. Ulrich, Naturwissenschaften *28*, 569 (1940).
[2] M. J. D. White, J. Morph. *79*, 323 (1946).
[3] A. Reitberger, Chromosoma *1*, 391 (1940).

aber in Metaphase angetroffen. Eine Spindel fehlt offenbar. In der Anaphase liegen die Chromosomen ungeordnet im ganzen Kernraum verteilt. Es kommt lediglich zur Chromosomenteilung, nicht aber zur Kernteilung. Dieser Vorgang, der also eine Endomitose darstellt, bewirkt, dass *ein* Kern wieder eine hohe Chromosomenzahl erhält. Jetzt schliesst für alle vier Kerne die erste Furchungsteilung an. Die Richtungskerne gehen nicht zugrunde, sondern beteiligen sich am weiteren Teilungsgeschehen.

Im Verlauf der ersten Furchungsteilungen erfolgt bei ♀♀ und ♂♂ eine Differenzierung in Soma und Keimbahn. Die prospektiven somatischen Kerne eliminieren den Hauptteil ihrer Chromosomen. Im ♀ wird in der dritten Furchungsteilung die Elimination bei drei der vier vom Furchungskern abstammenden Kerne vollzogen. Dabei rücken 11 Chromosomen zum Spindelpol. Die restlichen bleiben in der Spindelmitte liegen. Der in Polplasmanähe gelegene vierte Kern teilt sich ohne zu eliminieren. Einer seiner Tochterkerne holt die Elimination beim nächsten Teilungsschritt nach, der andere wird mit unverminderter Chromosomenzahl Keimbahnkern und kommt ins Polplasma zu liegen. Im ♂ wird die Keimbahn durch einen Abkömmling des nach der Meiose endomitotisch aufregulierten Kerns dargestellt, der ebenfalls nahe am Polplasma liegt und sich an der Elimination nicht beteiligt. Die Elimination erstreckt sich beim ♂ über drei Teilungen, nämlich über die 2., 3. und 4. Furchungsteilung. Während des zweiten Furchungsschrittes lassen null bis vier Kerne in Nähe der Nährkammer einen Teil ihrer Chromosomen in früher bis später Anaphase zurück. In der dritten Furchungsteilung wandern bei fast allen Kernen nur 6 Chromosomen zu jedem Spindelpol, abgesehen von einem oder mehreren Kernen in Polplasmanähe, deren Abkömmlinge erst beim vierten Furchungsschritt die niedrige Chromosomenzahl 6 erreichen. Der Eliminationsvorgang beginnt also im Bereich nahe der Nährkammer und erfasst die Kerne nach und nach in Richtung auf das Polplasma. Die ausgeschiedenen Chromosomen verschmelzen zu Chromatinklumpen, die bei allen älteren Embryonen im Plasma zu finden sind. Bei beiden Geschlechtern bleibt in einer späteren Teilung noch ein weiteres Chromosom in der Äquatorialebene zurück, so dass die endgültige Chromosomenzahl der Somazellen beim ♀ 10 (möglicherweise 5 Paare), beim ♂ 5 beträgt. Die Anzahl 10 für die Somazellen der ♀♀ gilt gleichermassen für REITBERGERS und unsere Tiere. Als Chromosomenzahl von Ei- und Keimbahnkernen der ♀♀ gibt REITBERGER 66 an. Seine Zählungen schwanken zwischen 56 und 69. Bei unseren Tieren liegt die Chromosomenzahl der Eikerne höher, wir zählten für ♀♀ wie ♂♂ 74 bis 82. Da diese Differenz höchstwahrscheinlich nicht auf der unterschiedlichen Methode beruht, liegt offenbar bei uns eine andere chromosomale Rasse vor als bei REITBERGER. Die Keimbahnkerne der ♂♂ enthalten meist weniger Chromosomen als die Keimbahnkerne der ♀♀, möglicherweise weil sich im primären Furchungskern des ♂-Eies nach der Reifung nicht alle Chromosomen an der endomitotischen Verdoppelung beteiligen. Die Spermatogenese verläuft bei *Oligarces* grundsätzlich wie bei *Miastor* (WHITE)[2]. In das Spermium werden bei *Oligarces* 7 Chromosomen aufgenommen. Über die Oogenese der «sexuellen Eier»[2] ist nichts bekannt.

Die geschilderten chromosomalen Vorgänge bei der pädogenetischen Entwicklung sind in der Abbildung vergleichend für ♂ und ♀ schematisch dargestellt.

ELISABETH HAUSCHTECK

Zoologisches Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, 16. März 1959.

Summary

In *Oligarces paradoxus*, the chromosomal behaviour was compared during pedogenetic development of ♀♀ and ♂♂. The ♀-egg undergoes a single non-reductional maturation division, the ♂-egg shows two divisions which result in reduced nuclei. After maturation in the ♂-egg, the number of chromosomes is restored by endomitosis. The nuclei of germ-line cells contain a high number of chromosomes (♀: 74–82; ♂: at least 58) in both sexes. In somatic nuclei, the number is diminished by elimination to 10 in ♀, to 5 in ♂.

Chromatographic Analysis of the Urinary Melanin Pigment

Urines of patients bearing malignant melanotic tumours often take on a black-brownish colour for the presence of a colourless melanogen that spontaneously originates the pigment when shortly oxidized by air: it evidently results from the overflowing into the urine of some products formed by the altered metabolism of pigments of the tumour tissue.

In order to study this melanotic pigment, I have submitted to chromatographic analysis the urines of a patient with a cutaneous malignant melanoma largely metastasized to the liver and limphnodes; in these urines Thormählen's reaction for melanin was clearly positive. The monodimensional chromatograms determined by the descending method, applying 0·05 ml of urine on Whatman No. 1 paper, after nearly 18 h migration at 18°C, separately in water-saturated phenol and in butanol-acetic acid-water (4:1:5), were dried and sprayed with Ehrlich's *p*-dimethylaminobenzaldehyde at 2%. Chromatograms put into phenol showed, besides a large and very prompt spot of brilliant-yellow colour with R_f 0·64 due to urea, three other grey-greenish slowly appearing spots with R_f: 0·24, 0·33, 0·40 respectively. The most conspicuous of them was the one in the middle, while the least visible was the slowest one: all of them were very stable. In chromatograms in butanol-acetic acid-water system, three greyish and scarcely enlarged spots, with R_f: 0·06, 0·24, 0·30 became evident: they formed slowly: they too were stable and the most intense of them was the spot with smaller R_f; the urea yellow spot also became evident with R_f 0·43, very diffuse and of very quick formation, and persistent.

Having left the urine at freezing temperature in ice-box for some time, I noted a decantation of the brown colour which progressively deposited on the bottom, while the upper part of the urine took on a light colour. The chromatographic analysis carried out on supernatant, light portion did not show evidence of the three greyish spots above-mentioned, and at the same time the Thormählen's reaction on this urine was negative. On the other hand, the Thormählen's reaction was positive, and the spots were obtained, with the lower part of the urines. Thus evidently the blackish colour, the positivity of the Thormählen's reaction, and the greyish spots of the chromatograms are due to the presence in urines of one or more substances scarcely soluble and therefore separable from the remnant by means of decantation.

It is a suggestive hypothesis to attribute the three greyish spots to melanotic pigment which is known to be a compound of low solubility. Of this substance, many researchers think that there are various kinds, chemically

similar one another; in fact, with chromatography its subdivision into three portions can be obtained.

E. Ghislandi

Clinica del Lavoro dell'Università di Milano, February 11, 1959.

Riassunto

Le urine di un paziente affetto da melanoma maligno sono state analizzate con la tecnica cromatografica per studiare il pigmento melanico in esse contenuto. Usando come rivelatore la *p*-dimetilaminobenzaldeide di Ehrlich sono state riconosciute tre chiazze che si ritiene di attribuire alla melanina, composto poco solubile e separabile dal resto mediante sedimentazione.

Studio farmacologico di un nuovo coleretico derivato dall'acido α-cicloesil butirrico

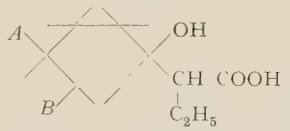
Maillard, Benard e Morin[1] avevano per primi notato le eccezionali proprietà coleretiche di una serie di acidi la cui formula generale era:

ove R era un nucleo ciclopentile o cicloesile tal quale o recante un gruppo metile, mentre R' era un alchile a basso numero di atomi di carbonio o un fenile.

I prodotti con migliore indice terapeutico si rivelarono quelli contenenti un ossidrile nella posizione 1 del nucleo cicloesilico. Dal lavoro di Maillard *et al.*[1] risultava come l'attività dei suddetti composti aumentasse con l'introduzione del metile nel nucleo cicloesilico.

Basandoci su questa osservazione, al fine di studiare molecole recanti al nucleo cicloesilico un sostituente aromatico, abbiamo preparato i derivati con un gruppo fenilico in posizione 3 e 4 del nucleo 1-ossi-cicloesilico e $R' = C_2H_5$.

Essi sono stati ottenuti facendo reagire secondo Reformatsky rispettivamente il 3- e 4-fenilcicloesanone con α-bromo-butirrato d'etile e saponificando quindi in ambiente alcalino gli esteri etilici degli α-ossi-acidi.



$A = C_6H_5$; $B = H$ = M. G. 4833 — p. f. 157
$A = H$; $B = C_6H_5$ = M. G. 4834 — olio

Alcune prove di orientamento hanno dimostrato per entrambe le sostanze una notevole attività coleretica, maggiore per l'M. G. 4833; su questo composto si è perciò condotta la maggior parte degli esperimenti.

L'attività coleretica è stata indagata misurando ogni 15 min (e ogni 30 min nei ratti), il volume della bile defluita da una fistola temporanea del coledoco, incannulato con un tubicino di politene, in animali di varie specie (ratti, conigli e cani) digiuni da 12–18 h, narcotizzati con 0,25 ml/kg di una soluzione acquosa, contenente ogni 100 ml 20 g di uretano, 3 g di pentobarbital, 5 g di Dial.

[1] J. Maillard, M. Benard e R. Morin, Bull. Soc. Chim. France *1958*, 244.

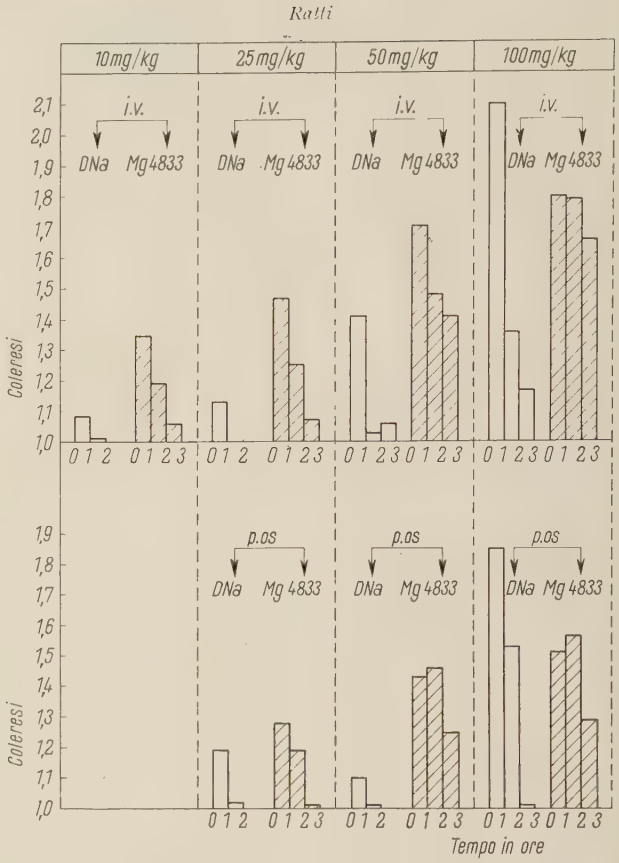


Fig. 1. Coleresi (rapporto fra il flusso biliare nelle ore successive al trattamento e il flusso biliare di controllo posto = 1). (DNa = deidrocolato sodico.)

Nei conigli e nei cani veniva pure legato il dotto cistico per eliminare un eventuale effetto delle sostanze sulla colecisti; un altro tubo di politene inserito nel moncone periferico

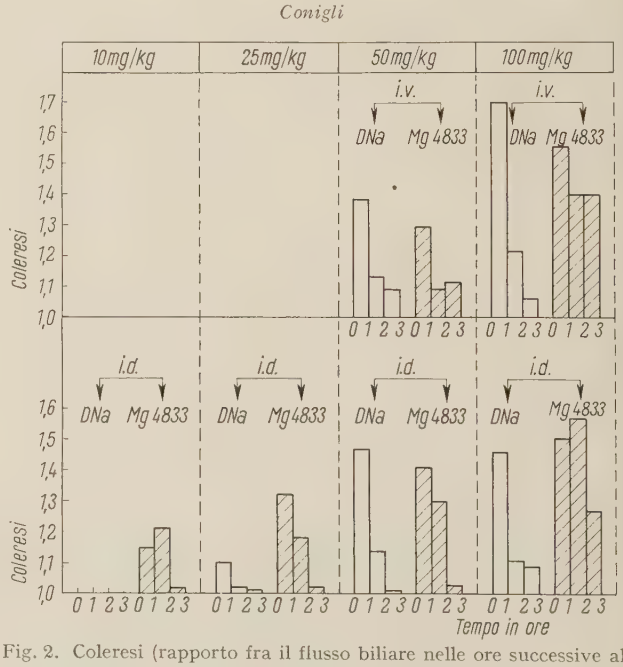


Fig. 2. Coleresi (rapporto fra il flusso biliare nelle ore successive al trattamento e il flusso biliare di controllo posto = 1). (DNa = deidrocolato sodico.) (i. d. = *intraduodeno*)

Tabella

	Cane trattato con M. G. 4833 25 mg/kg intraduodeno		Variazione %	Cane trattato con M. G. 4833 50 mg/kg intraduodeno		Variazione %
	Prima del trattamento	Dopo il trattamento		Prima del trattamento	Dopo il trattamento	
Flusso biliare in ml	5,7 (30 min)	11	+92	1,75	5	+186
Residuo secco in % del peso di bile fresca	5,57	5	−11	3,59	2,14	− 40
Colesterolo mg/100 cm³ di bile . .	16,25	8,50	−48	20,41	16,25	− 20

del coledoco verso il duodeno o una sonda gastrica applicata attraverso l'esofago nei ratti serviva per la somministrazione dei farmaci per via gastroduodenale; tutti gli animali ricevevano ogni mezz'ora per via gastrointestinale circa $^1/_3$ del volume della bile emessa e ogni ora, a partire dalla fine dell'intervento operatorio, 5 ml/kg di soluzione salina isotonica sotto cute.

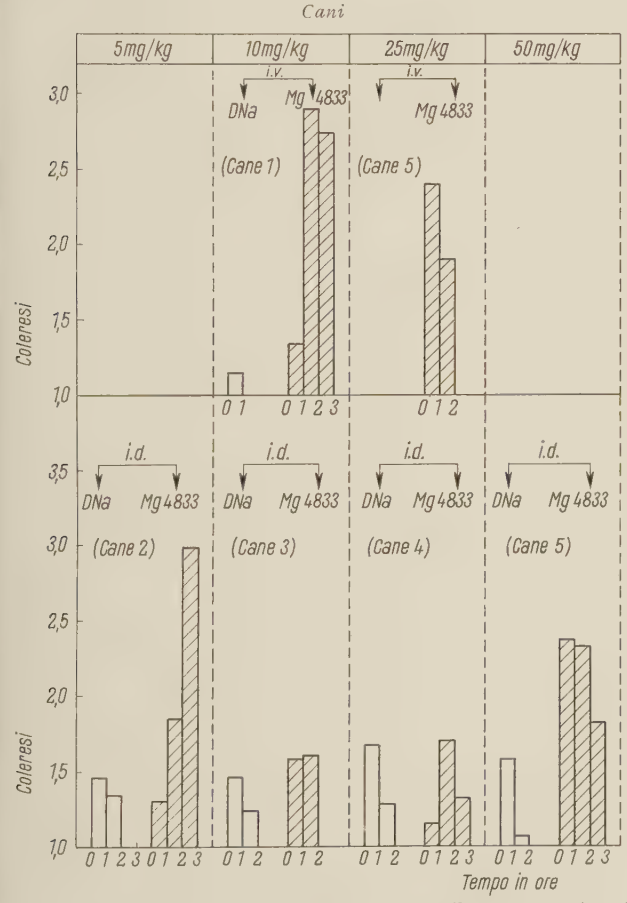


Fig. 3. Coleresi (rapporto fra il flusso biliare nelle ore successive al trattamento e il flusso biliare di controllo posto = 1).
(DNa = deidrocolato sodico.)
(i. d. = *intraduodeno*)

Il flusso biliare normale veniva controllato per almeno 2 h prima del trattamento; per ogni dose delle sostanze e tipo di trattamento vennero impiegati gruppi di 6–8 ratti e di 3–4 conigli; gli esperimenti su cani furono eseguiti complessivamente su 5 animali, mantenuti alla stessa dieta per 8–10 giorni prima del trattamento; gli esperimenti di confronto con deidrocolato sodico vennero condotti alternando nello stesso cane dosi uguali di questa sostanza e di M. G. 4833.

L'aumento della coleresi fu riscontrato nei ratti e nei conigli da dosi di 10 mg/kg sia per via gastroduodenale che endovenosa e, nei cani, negli esperimenti finora compiuti, da dosi di 5 mg/kg. Nelle figure 1, 2, 3 i risultati sono espressi ponendo uguale ad 1 il flusso biliare di controllo per ora: da questi si rileva che l'M.G. 4833 è nettamente più attivo del deidrocolato sodico, soprattutto a basse dosi, ed ha una durata d'azione sensibilmente più lunga in tutte le specie animali studiate ed in ogni tipo di esperimento.

Per l'M.G. 4833 è stata inoltre determinata, col metodo di Litchfield e Wilcoxon[2] la DL_{50} acuta in topi albini, che risulta essere di 420 mg/kg per via endovenosa (lim. fid. per $P = 0{,}05$ 445–396) e 950 mg/kg per os (lim. fid. 1020–879).

L'esame istologico del fegato, rene, cuore, milza e surrene al termine di prove di tossicità prolungata, condotte su conigli trattati con 50 mg/kg per os al dì per 60 giorni, non ha rivelato alterazioni degne di nota rispetto ai controlli. Sottoponendo parte degli animali, al termine di questo trattamento, a prove di funzionalità epatica (eliminazione della bromosulfaleina) e calcolando l'indice di ritenzione secondo Thomson[3] non si sono ottenuti dati diversi dai controlli; l'indice di ritenzione percentuale essendo in tutti gli animali minore del 5%.

L'effetto coleretico è solo in parte dovuto alla diluizione della bile, poichè i dati della Tabella dimostrano come la diminuzione percentuale del residuo secco e del contenuto in colesterolo della bile sia notevolmente inferiore all'aumento percentuale del flusso biliare dopo trattamento con M.G. 4833. Ciò potrebbe significare che la sostanza esaminata favorisce anche una maggior produzione dei componenti specifici della bile da parte della cellula epatica.

In prove compiute su preparati di vescichetta isolata di cavia in bagno di liquido di Tyrode, concentrazioni di sostanza di 1:10000 e 1:5000/ml di liquido del bagno non provocano la minima contrazione nè modificazione del tono della muscolatura liscia della cistifellea, né alterano la sua reattività di fronte a sostanze quali l'acetilcolina e il $BaCl_2$. In maniera del tutto analoga si comporta un preparato di intestino tenue di cavia.

[2] J. T. Litchfield e F. J. Wilcoxon, J. Pharm. exp. Thér. *96*, 99 (1949).

[3] R. A. E. Thomson, D. B. McKaig e S. M. Michaelson, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *95*, 243 (1957).

L'M.G. 4833 può quindi essere classificato fra i coleretici puri.

Ringraziamo il Sig. E. Grassi e la Dr.ssa A. Cattaneo per la fattiva collaborazione prestata.

M. Carissimi, F. Ravenna,
E. Milla e E. Grumelli

Laboratori Ricerche Maggioni & C., Milano, il 16 marzo 1959.

Summary

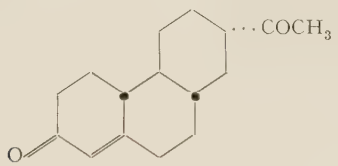
α-(1-Hydroxy-4-phenyl-cyclohexyl)butyric acid (M.G. 4833) and α-(1-hydroxy-3-phenyl-cyclohexyl) butyric acid (M.G. 4834) have been synthesized; both substances were endowed with choleretic activity.

M.G. 4833 is the more active; it acts at lower doses and for a longer time than sodium dehydrocholate on rats, rabbits and dogs submitted to temporary fistulization of the bile-duct.

Hemmung der experimentellen, testosteronbedingten Epidermisproliferation an der weiblichen Ratte durch ein synthetisches Phenanthrenderivat mit antiandrogener Wirkung

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über Angriffsorte von Cortison führten Studer[1] sowie Studer und Frey[2] unter anderem eine Reihe von Versuchen an der proliferierenden Epidermis der Ratte durch. Sie konnten dabei zeigen, dass nicht nur Vitamin A, sondern in noch stärkerem Masse auch Testosteronpropionat die Epidermis der Versuchstiere zur Proliferation anregte. Intramuskulär verabreichte Tagesdosen von 2 × 40 mg/kg dieses Androgens riefen – offenbar auf Grund einer anabolen Wirkung – eine ausgeprägte Mehrschichtigkeit mit Akanthose, eine erhebliche Verbreiterung aller epithelialen Zellschichten sowie eine signifikante Vermehrung der Mitosen hervor.

Nachdem Pincus und Dorfman[3] schon früher über Testosteronantagonisten berichtet hatten, ist es neuerdings Goldberg und Scott[4] gelungen, ein Phenanthrenderivat mit antiandrogenem Effekt zu synthetisieren. Für diese Substanz, Ro 2-7239 (I), wurde folgende Strukturformel ermittelt:



I

2-Acetyl-7-oxo-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,9,10,10a-dodecahydrophenanthren.

Wie Randall und Selitto[5] feststellten, vermag dieses neue Phenanthrenderivat die durch Testosteronpropionat provozierbare Hypertrophie der Samenblase und Prostata sowie des Musculus levator ani an der juvenilen, kastrierten Ratte zu verhindern. Die antiandrogene Wirkung von I gegenüber exogenem Testosteron wurde von Dorfman[6] am Hahnenkamm-Test bestätigt. Unter diesen Umständen erschien uns die Prüfung dieser chemischen Verbindung im vorhin skizzierten Modell nach Studer sinnvoll. Als Kriterien dienten uns die Dicke der Epidermis sowie die in der Haut pro Masseinheit auftretenden Mitosezahlen.

Versuchsanordnung. Um endogen produzierte Androgene als Versuchsfaktor zu eliminieren, wählten wir als Testobjekt weisse Ratten weiblichen Geschlechts aus eigener Zucht. 4 Gruppen zu je 6 Tieren im Gewicht von 110 bis 120 g erhielten an 4 aufeinanderfolgenden Tagen zweimal 40 mg/kg/*die* Testosteronpropionat intraperitoneal verabreicht. Dazu kamen simultan folgende intraperitoneale Applikationen:

Gruppe 1: 2 × 40 mg/kg Cortison —
Gruppe 2: 2 × 40 mg/kg I in 25%igem Propylenglycol
Gruppe 3: 2 × 20 mg/kg I in 25%igem Propylenglycol
Gruppe 4: 25%iges Propylenglycol in adäquaten Mengen.

Weitere 6 Ratten dienten als unbehandelte Kontrollen (Gruppe 5).

Am 5. Versuchstage wurde sämtlichen Tieren zwecks Blockierung der Mitosen 1 mg/kg Colchizin subkutan verabreicht (Dustin-Reaktion[7]). Tötung der Tiere 9 bis $9^1/_2$ h später. Zur histologischen Untersuchung gelangte von jedem Tier ein Stück Haut aus der Rückengegend. Nach einstündiger Fixation in Susa und Einbettung in Paraffin wurden möglichst senkrecht zur Oberfläche 5 μ dicke Schnitte hergestellt und mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Im Mikroskop erfolgte dann die Messung der Epidermisdicke ohne Stratum corneum an je 20 verschiedenen Stellen mittels Okularmikrometers sowie die Auszählung der Mitosen in der Epidermis (20 Gesichtsfelder bei einer Vergrösserung von 1:200).

Ergebnisse. Die Durchschnittswerte der Mess- bzw. Zählergebnisse sind in Tabelle I und II aufgeführt. Dieser Zusammenstellung kann entnommen werden, dass die Applikation von täglich zweimal 40 mg/kg Testosteronpropionat intraperitoneal allein (Gruppe 4) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Gruppe 5) eine beträchtliche Verbreiterung der Epidermis im Sinne einer Akanthose sowie eine erhebliche Vermehrung der Mitosen bewirkte. Beide Veränderungen sind statistisch hoch signifikant und dürfen somit als Bezugsbasis für die Interpretation der in den Gruppen 1–3 erhobenen Befunde herangezogen werden. Vergleichend ergeben sich dabei folgende Relationen:

1. Die experimentell hervorgerufene «Akanthose» wurde durch täglich 2 × 40 mg/kg Cortison (Gruppe 1) nicht nur gehemmt, sondern es kam darüber hinaus zu einer beträchtlichen Verschmälerung der Epidermis gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren der Gruppe 5. Dies gilt grundsätzlich auch für das Phenanthrenderivat I, wobei diese Verbindung die Proliferationswirkung von Testosteronpropionat bei gewichtsgleicher Dosierung (Gruppe 2) signifikant stärker antagonisierte als Cortison und selbst die Dosis von zweimal 20 mg/kg/Tag (Gruppe 3) noch immer einen mindestens ebenso deutlichen Hemmeffekt zeigte wie 2 × 40 mg/kg Cortison.

2. Gleichsinnige Tendenzen kamen auch in bezug auf die Mitoseaktivität zum Ausdruck. Während Cortison in

[1] A. Studer, Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss. *8*, 60 (1952).
[2] A. Studer und J. R. Frey, Dermatologica (Basel) *104*, 578 (1952).
[3] G. Pincus und R. I. Dorfman, Fed. Proc. *14*, 115 (1955).
[4] M. W. Goldberg und W. E. Scott, unveröffentlicht.
[5] L. O. Randall und J. J. Selitto, Endocrinology *62*, 693 (1958).
[6] R. I. Dorfman, Endocrinology *64*, 464 (1959).
[7] A. P. Dustin, C. R. Soc. Anat. *1938*, 205.

Tabelle I

Wirkungen von Cortison, Testosteronpropionat und Phenanthrenderivat I auf die Dicke der Epidermis bei 4tägiger intraperitonealer Verabreichung

Gruppen Dosierungen	Durchschnittliche Dicke der Epidermis in μ	Ratten Anzahl	t	p
1. Täglich 2×40 mg/kg Testosteronpropionat + 2×40 mg/kg Cortison	12,5 ± 1,15	6	3,74	< 0,01
2. Täglich 2×40 mg/kg Testosteronpropionat + 2×40 mg/kg I	8,9 ± 0,96	6	7,77	< 0,001
3. Täglich 2×40 mg/kg Testosteronpropionat + 2×20 mg/kg I	11,3 ± 1,56	6	4,32	< 0,01
4. Täglich 2×40 mg/kg Testosteronpropionat	22,3 ± 3,04	6	4,15	< 0,01
5. Unbehandelte Kontrollen	15,9 ± 1,79	6	–	–

Tabelle II

Wirkungen von Cortison, Testosteronpropionat und Phenanthrenderivat I auf die Mitoseaktivität der Epidermis bei 4tägiger intraperitonealer Verabreichung

Gruppen Dosierungen	Durchschn. Anzahl Mitosen in 20 Gesichtsfeldern bei einer Vergröss. von 1:200	Ratten Anzahl	t	p
1. Täglich 2×40 mg/kg Testosteronpropionat + 2×40 mg/kg Cortison	143,0 ± 17,85	6	4,01	< 0,01
2. Täglich 2×40 mg/kg Testosteronpropionat + 2×40 mg/kg I	84,5 ± 15,92	6	0,52	< 0,61
3. Täglich 2×40 mg/kg Testosteronpropionat + 2×20 mg/kg I	105,5 ± 21,32	6	1,21	< 0,22
4. Täglich 2×40 mg/kg Testosteronpropionat	241,0 ± 47,88	6	7,06	< 0,001
5. Unbehandelte Kontrollen	91,0 ± 20,00	6	–	–

der Dosierung von täglich 2 × 40 mg/kg die durch Testosteronpropionat angeregten Kernteilungsprozesse zwar ziemlich stark zu hemmen, nicht aber vollständig zu unterdrücken vermochte, wurde die Kernproliferation durch I völlig aufgehoben, das heisst, es wurden hier Mitosezahlen gefunden, die nahe dem Durchschnittswert der unbehandelten Kontrollgruppe lagen. Bemerkenswert ist, dass dies für beide Dosierungsstufen zutraf, also auch für die niedrigere Dosis von täglich zweimal 20 mg/kg (Gruppe 2).

Diskussion. Mess- und Zählergebnisse an der Epidermis zeigen somit, dass das Phenanthrenderivat I an der weiblichen Ratte die durch exogen zugeführtes Testosteronpropionat provozierbaren, proliferativen Hautveränderungen mindestens doppelt so stark antagonisiert wie Cortison. Sowohl nach der Epidermisdicke wie nach den Mitosezahlen zu schliessen, ist diese Wirkung innerhalb gewisser Grenzen dosisabhängig. Bezüglich der Hautdicke ist der Unterschied zwischen der grösseren und der kleineren Dosis statistisch signifikant ($p = 0{,}001$).

Die eben besprochenen Untersuchungsergebnisse dürften in der gleichen Linie wie der von Randall und Selitto[5] erhobene Befund liegen, wonach I die myotrophe Wirkung von Testosteronpropionat an der kastrierten männlichen Ratte hemmt. Somit scheint sich die antagonistische Beeinflussung proliferativer Gewebstendenzen nicht auf ein einzelnes Organ zu beschränken. Die Vermutung ist deshalb naheliegend, dass dem Phenanthrenderivat – ähnlich wie dem Cortison – eine antianabole Wirkung zukommt. Wenn diese Hypothese zutreffen sollte, stellt sich die Frage, ob ein solcher Effekt selektiv auf Stoffwechselvorgänge gerichtet sei, die im wesentlichen durch androgene Hormone gesteuert werden, oder ob durch I proliferative Vorgänge in der Epidermis allgemein, das heisst unabhängig von ihrer Genese gehemmt werden (Hautveränderungen bei Vitamin-A-Hypervitaminose bzw. nach Adrenalektomie).

E. Läuppi und A. Studer

Abteilung für experimentelle Medizin der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel, 24. April 1959.

Summary

In the female rat, testosterone propionate-induced proliferation of the epidermis ('acanthosis' and mitotic activation) is inhibited in proportion to dosage by a phenanthrene derivative with antiandrogenic action.

Abschwächung der Noradrenalin-Wirkung auf die isolierte Aorta bei Hemmung der Monoaminoxydase

N_2-Isopropyl-isonicotinsäurehydrazid (IIH, Marsilid[1]) verursacht langdauernde Hemmung des Fermentes Monoaminoxydase (MAO)[2]. Dadurch kommen Abbauverzöge-

[1] Fabrikmarke.

[2] E. A. Zeller, J. Barsky, J. R. Fouts, W. F. Kirchheimer und L. S. van Orden, Exper. *8*, 349 (1952). – E. A. Zeller, J. Barsky, E. R. Berman und J. R. Fouts, J. Lab. clin. Med. *40*, 965 (1952). – E. A. Zeller und J. Barsky, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *81*, 459 (1952). – R. W. Schayer, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *84*, 60 (1953). – G. Viollier, E. Quiring und H. Staub, Helv. chim. Acta *36*, 721 (1953).

Amin	Kontraktion (Kontrollen = 100)							
	IIH				INH			
	Nach 1 Minute		Maximal		Nach 1 Minute		Maximal	
	Kontrollen	Behandelt	Kontrollen	Behandelt	Kontrollen	Behandelt	Kontrollen	Behandelt
Noradrenalin . . . . . 1 γ	100 ± 9	**64 ± 7**	100 ± 16	**37 ± 7**	100 ± 5	95 ± 10	100 ± 7	93 ± 13
Noradrenalin . . . . . 5 γ	100 ± 7	**64 ± 7**	100 ± 16	**1 ± 4**	100 ± 10	123 ± 15	100 ± 13	135 ± 25
5-Hydroxytryptamin-kreatininsulfat . . . . . 10 γ	100 ± 28	94 ± 28	100 ± 30	78 ± 22	100 ± 15	90 ± 20	100 ± 14	90 ± 19
5-Hydroxytryptamin-kreatininsulfat . . . . . 100 γ	100 ± 23	51 ± 17	100 ± 34	30 ± 11	100 ± 8	116 ± 20	100 ± 11	107 ± 18

Die Zahlen bedeuten Durchschnittswerte und mittlere quadratische Abweichung von je 12–15 Versuchen. Es wurden in jedem Versuch zwei verschiedene Stücke einer Aorta geprüft und die Mittelwerte für die statistische Berechnung eingesetzt. An jedem Aortenstück wurden sowohl Noradrenalin als auch 5-Hydroxytryptamin untersucht; Zugabe der Amine zur Badflüssigkeit in der auf der Tabelle angegebenen Reihenfolge.

Halbfett gesetzte Werte: Unterschied gegenüber Kontrollen signifikant ($p < 0{,}01$). — Normal gesetzte Werte: Unterschied nicht signifikant ($p > 0{,}05$).

rung und Anstieg von endogenen Monoaminen (5-Hydroxytryptamin, Katecholaminen) in verschiedenen Organen zustande[3]. Es ist wahrscheinlich, dass die pharmakologische Wirkung von IIH auf das Zentralnervensystem zum Teil durch Hemmung des Monoaminabbaus bedingt ist[4]. Auch die durch IIH hervorgerufene Verstärkung zentralnervöser Effekte (Hyperthermie, Erregung) nach Injektion von Monoaminen und deren Vorstufen kommt wahrscheinlich als Folge von Abbauhemmung und Aktivitätssteigerung der Monoamine zustande[5].

Die nach wiederholter IIH-Medikation beim Menschen beobachtete orthostatische Hypotonie[6] kann kaum mit einer Verstärkung der Wirkung endogener Katecholamine vereinbart werden. Dies würde eher zu Blutdrucksteigerung führen. Es muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Wirkung der Pressoramine auf das arterielle System durch IIH abgeschwächt wird. Diese Vermutung beruht auf dem Befund, dass die durch Adrenalin bedingte Kontraktion der isolierten Aorta nach Zugabe von IIH zur Badflüssigkeit abgeschwächt oder nicht verändert wurde[7]. Ferner bewirkte IIH keine Verstärkung oder eine Abschwächung des Nickhaut- und Blutdruck-Effektes von Katecholaminen[8].

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in welcher Weise Injektion von IIH am Ganztier die Wirkung von Noradrenalin (NA) und 5-Hydroxytryptamin (5HT) auf die isolierte Aorta beeinflusst. Versuche mit Isonikotinsäurehydrazid (INH, Rimifon[1]), einem im Gegensatz zu IIH nur schwach wirksamem MAO-Hemmer[9], dienten als Vergleich.

Methodik. Spiralig geschnittene Stücke der *Aorta thoracica* von 2,9 bis 3,7 kg schweren Kaninchen wurden nach Furchgott und Bhadrakom[10] in ein mit Krebsscher Lösung gefülltes Darmbad von 50 cm³ gebracht. Zugabe von 1 und 5 γ L-Noradrenalin bzw. 10 und 100 γ 5-Hydroxytryptamin-kreatininsulfat; Messung der maximalen Kontraktionshöhe sowie der Kontraktionshöhe nach 1 min. 50 mg/kg INH bzw. äquimolare Dosen IIH-Phosphat wurden je 44 und 20 h vor Versuchsbeginn intravenös verabreicht. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrollen. An einem Tage wurden immer zwei Kontroll- und zwei behandelte Tiere untersucht.

Resultate (siehe Tabelle).

1. Die durch 1 und 5 γ NA bewirkte Kontraktion der isolierten Aorta wurde durch Vorbehandlung der Tiere mit IIH signifikant abgeschwächt ($p < 0{,}01$). INH hatte keinen signifikanten Einfluss auf die NA-Kontraktion ($p > 0{,}05$).

2. IIH bewirkte eine durchschnittliche, aber nicht signifikante Verminderung der durch 5HT bedingten Aortenkontraktion ($p > 0{,}05$). INH erzeugte keine Abschwächung der 5HT-Kontraktion.

Diskussion. Die Abschwächung der NA-Wirkung auf die isolierte Aorta durch IIH könnte zur Vermutung Anlass geben, dass beim Abbau von NA in der Aortenwand MAO nicht wesentlich beteiligt ist. Die fehlende Beeinflussung der NA-Kontraktion durch INH spricht jedoch unter anderem dafür, dass MAO-Hemmung wahrscheinlich bei der durch IIH bewirkten NA-Abschwächung eine Rolle spielt. Der wesentliche biologische Unterschied der chemisch nahe verwandten Verbindungen IIH und INH besteht im Grad der MAO-Hemmung.

Mit 5HT zeigen sich gleichsinnige Resultate wie mit NA. Es ist jedoch statistisch nur gesichert, dass IIH den 5HT-Effekt nicht verstärkt. Die durchschnittliche Verminderung der 5HT-Kontraktionen durch IIH ist im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen nicht signifikant. Immerhin ergeben diese Befunde Anhaltspunkte dafür, dass der Wirkung von IIH auf NA und 5HT möglicherweise der gleiche Mechanismus zugrunde liegt.

[3] S. Udenfriend, H. Weissbach und D. F. Bogdanski, Ann. N.Y. Acad. Sci. *66*, 602 (1957); J. Pharmacol. exp. Ther. *120*, 255 (1957). — A. Pletscher, Exper. *12*, 479 (1956); Helv. physiol. pharmacol. Acta *14*, C76 (1956). – P. A. Shore and B. B. Brodie, Science *127*, 704 (1958).

[4] A. Pletscher, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1959 (im Druck).

[5] H. P. Bächtold und A. Pletscher, Exper. *13*, 163 (1957). – S. Udenfriend, H. Weissbach und D. F. Bogdanski, Ann. N.Y. Acad. Sci. *66*, 602 (1957). – A. Carlsson, M. Lindquist und T. Magnusson, Nature *180*, 1200 (1957).

[6] H. Staub, Helv. med. Acta *19*, 480 (1952). – Conference on Amine Oxidase Inhibitors. New York Academy of Sciences, November 1958: Ann. N.Y. Acad. Sci. 1959 (im Druck).

[7] E. C. Griesemer, C. A. Dragstedt, J. A. Wells und E. A. Zeller, Exper. *11*, 182 (1955). – R. F. Furchgott, P. Weinstein, H. Huebl, P. Bozorgmehri und R. Mensendiek, Fed. Proc. *14*, 342 (1955).

[8] E. C. Griesemer, J. Barsky, C. A. Dragstedt, J. A. Wells und E. A. Zeller, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *84*, 699 (1953). – H. Balzer und P. Holtz, Arch. exp. Path. Pharm. *227*, 547 (1956). – H. Schmitt und P. Gonnard, C. R. Acad. Sci. *240*, 2573 (1955); Arch. int. Pharmacodyn. *108*, 74 (1956). – J. H. Burn, F. J. Philpot und U. Trendelenburg, Brit. J. Pharmacol. *9*, 423 (1954).

[9] E. A. Zeller und J. Barsky, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *81*, 459 (1952).

[10] R. F. Furchgott und S. Bhadrakom, J. Pharmacol. exp. Ther. *108*, 129 (1953).

Der Zusammenhang von MAO-Hemmung und Abschwächung der NA-Wirkung ist nicht klar. Neuere Befunde, wonach die Ansprechbarkeit der Arterienwand von der Konzentration des endogenen NA in der Gefässwand abhängt, bieten eine Erklärungsmöglichkeit. Reserpin, welches den Gehalt von endogenem NA in den Arterien vermindert, erhöht deren Empfindlichkeit auf exogenes NA[11]. Möglicherweise bewirkt IIH Zunahme von endogenem NA in der Gefässwand, wobei im Gegensatz zu Reserpin eine Verminderung der NA-Empfindlichkeit der Aorta zustande kommt.

Im Myokard steigt der Gehalt von endogenem NA nach IIH-Behandlung an[12]. Ferner bewirkt injiziertes NA stärkeren Anstieg dieses Amins im Myokard nach Vorbehandlung mit IIH als ohne Vorbehandlung[13]. Es bleibt noch abzuklären, ob IIH den NA-Stoffwechsel in der Aortenwand in gleicher Weise beeinflusst wie im Herzen.

Verminderte Ansprechbarkeit des Gefäßsystems auf NA könnte das Zustandekommen von orthostatischer Hypotonie beim Menschen während IIH-Behandlung möglicherweise erklären.

H. P. Bächtold und A. Pletscher

Abteilung für experimentelle Medizin der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel, 6. Mai 1959.

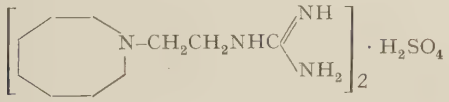
Summary

Twenty hours after pretreatment of rabbits with the monoamine oxidase inhibitor N_2-isopropyl-isonicotinic acid hydrazide (IIH) the norepinephrine induced contraction of the isolated aorta was significantly reduced; the 5-hydroxytryptamine sensitivity could not be changed significantly. Isonicotinic acid hydrazide (INH), a weak monoamine oxidase inhibitor, had no significant effect on the norepinephrine and 5-hydroxytryptamine sensitivity of the aorta.

[11] J. H. Burn und M. J. Rand, Brit. med. J. *1958/I*, 903; J. Physiol. *144*, 314 (1958).
[12] A. Pletscher, Exper. *14*, 73 (1958).
[13] A. Pletscher und K. F. Gey, in Vorbereitung.

[2-(Octahydro-1-azocinyl)-ethyl]-guanidine sulfate (CIBA 5864-SU), a New Synthetic Antihypertensive Agent

SU-5864, which is [2-(octahydro-1-azocinyl)-ethyl]-guanidine sulfate has been studied to ascertain its antihypertensive properties in animals:



$7^1/_2$ to 15 mg/kg intravenously of SU-5864 markedly lowered the arterial pressure of unanesthetized renal and neurogenic hypertensive dogs while its effects on the arterial pressure of the unanesthetized normotensive dog were slight. In the anesthetized normotensive dog SU-5864 inhibited carotid occlusion reflex pressor responses and antagonized the severe pressor responses elicited by high doses of amphetamine.

Marked delayed relaxation of the nictitating membranes of dogs and cats was produced by 10 to 15 mg/kg SU-5864 intravenously. As demonstrated in the cat this relaxation was associated with a blockade of transmission somewhere in the cervical sympathetic trunk-smooth muscle complex, such that the nictitating membranes could not be retracted by preganglionic faradization. Except for a very transient period SU-5864 did not interfere with transmission across the superior cervical ganglion nor with the conduction along pre- or post-ganglionic nerve fibers. However, at the same time that the nictitating membranes could not be retracted by nerve stimulation, they were demonstrated to be hypersensitive to injected norepinephrine. From these data we infer that SU-5864 must produce an inhibition of the release and/or distribution of transmitter substances from sympathetic nerve terminals.

The effects described above last for periods ranging from 5 to 20 days following a single intravenous administration of SU-5864.

A convenient method of preparation utilized octahydroazocine[1] as starting material. Treatment with chloroacetonitrile gave the octahydro-1-azocineacetonitrile, b.p. 114–118°C/14 mm; $n_D^{24} = 1{\cdot}4720$; calculated for $C_9H_{16}N_2$: C 71·11; H 10·61; N 18·43; Found: C 71·17; H 10·62; N 18·36. Lithium aluminium hydride reduction of the nitrile yielded octahydro-1-azocineethylamine, b.p. 108–111°C/14 mm; $n_D^{22} = 1{\cdot}4830$; calculated for $C_9H_{20}H_2$: C 69·29; H 12·92; N 17·96; Found: C 69·26; H 12·94; N 17·89. Reaction of the amine with S-methylisothiourea sulfate resulted in the formation of the above described SU-5864 which was recrystallized from aqueous ethanol and melted with decomposition at 276–281°C; calculated for $(C_{10}H_{22}N_4)_2 \cdot H_2SO_4$: C 48·55; H 9·37; N 22·65; S 6·48; Found: C 48·49; H 9·51; N 22·49; S 6·33.

R. A. Maxwell, R. P. Mull, and A. J. Plummer

Research Department, CIBA Pharmaceutical Products Inc., Summit (New Jersey), May 4, 1959.

Résumé

On décrit la chimie et la pharmacologie d'un nouvel agent antihypertenseur.

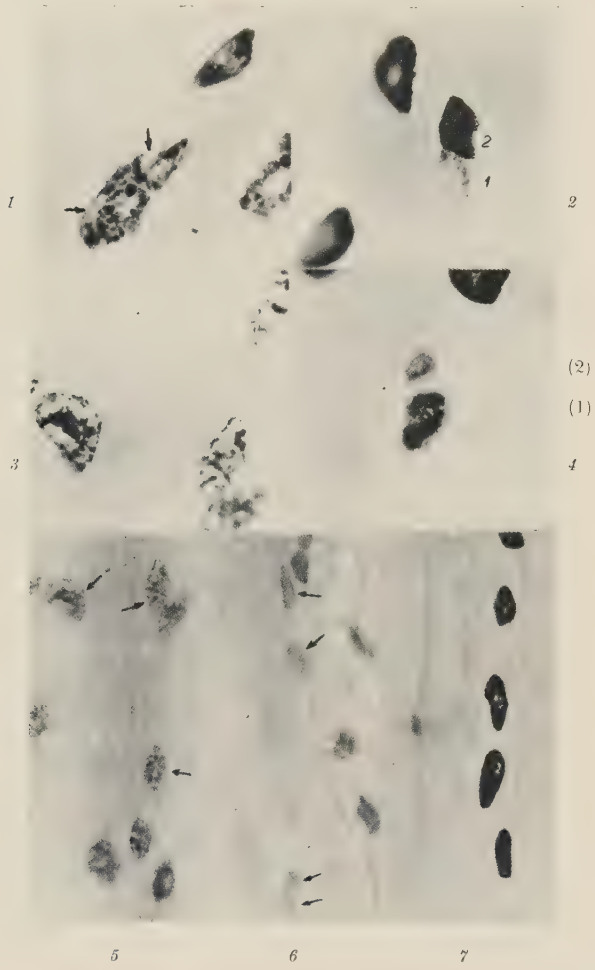
[1] F. F. Blicke and N. J. Doorenbos, J. Amer. chem. Soc. *76*, 2317 (1954).

On the Relation between the Secretion of the Perivascular Mast Cells and the Serum Level of Mucoproteins

The mast cells are well known as producers of histamine, 5-hydroxytryptamine, heparin, and hyaluronic acid[1]. We have already demonstrated their secretory changes under experimental conditions[2–4] resulting in a heparinemia[5–8]

[1] G. P. Fulton, F. L. Maynard, J. F. Riley, and G. B. West, Physiol. Rev. *37*, 221 (1957).
[2] M. Hill, Nature *180*, 654 (1957).
[3] M. Hill and M. Praslička, Acta haemat. *19*, 278 (1958).
[4] M. Hill, Acta anat. *35*, 118 (1958).
[5] H. Engelberg, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *97*, 304 (1958).
[6] J. G. Allen, M. Sanderson, M. Milham, A. Kirschon, and L. O. Jacobson, J. exp. Med. *87*, 71 (1948).
[7] R. J. Havel and E. Boyle, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N.Y. *85*, 468 (1954).
[8] R. P. White and P. H. Woodard, Amer. J. Physiol. *188*, 189 (1957).

or in an increased serum polysaccharide level[9]. From these observations, a more general suggestion could be deduced, including the relation of mast cell secretion to the serum level of hexosamine containing compounds, such as mucoproteins.



The microphotographs illustrate the perivascular mast cells of the mesentery after toluidine blue staining.

Fig. 1.—3 h after injection of cortisol in adrenalectomized rat. Metachromatically stained vacuoles in mast cells of lymphatic adventitia. Here and there (↗) loss of stainability of granules. × 660.

Fig. 2. -3 h after injection of cortisol in adrenalectomized rat. Loss of granule stainability in mast cell (1) of lymphatic adventitia. In the cytoplasm there are sporadic small, metachromatically stained droplets. The mast cell in close vicinity (2) is still intact. × 660.

Fig. 3.—24 h after injection of formaldehyde in normal rat. Partial lysis in mast cells of arteriole adventitia. In the cytoplasm only a metachromatically stained network remains. × 660.

Fig. 4. -24 h after injection of formaldehyde in adrenalectomized rat. Beginning of total lysis of mast cell granules (1) in arteriole adventitia. Around the cell a metachromatically stained halo is visible. In the mast cell in close vicinity (2) the total lysis of granules is already complete. × 660.

Fig. 5.—24 h after injection of formaldehyde in adrenalectomized rat. Partial lysis in mast cells (↗) of arteriole adventitia. × 380.

Fig. 6. –24 h after injection of cortisol in adrenalectomized rat. Loss of granule stainability in mast cells (↗) of lymphatic adventitia. × 380.

Fig. 7. –Normal mast cells of lymphatic adventitia in adrenalectomized control rat six days after adrenalectomy. × 380.

[9] B. Shacter, H. Supplee, and C. Entenman, Amer. J. Physiol. *169*, 508 (1952).

	0 h	24 h	48 h
Formol stress in normal rats	24 ± 2·7	43 ± 12·5 §	36 ± 2·6§
Cortisol in normal rats .		31 ± 2·6*	29 ± 1·5
Formol stress in adrenalectomized rats . . .	28·2 ± 3·7	43 ± 6·1§	40·2 ± 7·9
Cortisol in adrenalectomized rats . . .		46·5 ± 5·5§	56 ± 6·0§

The values of serum mucoproteins expressed in relative thymol units. * $p < 0{\cdot}05$; § $p < 0{\cdot}02$.

An increase of serum mucoproteins was achieved by stress[10] elicited either by a single intramuscular injection of 0·3 ml/100 g of 4% formaldehyde, or by an intramuscular injection of 4 mg/100 g cortisol (Scheroson *F* «Schering») in normal and in adrenalectomized rats, six days after adrenalectomy. 84 male Wistar rats including the controls, were used; they were, 3–5 months old, their body weight were 180–220 g. The rats were killed by decapitation 3, 6, 12, 24, 48 h after injection. Specimens of the mesentery and omentum maius were prepared in a standard manner[4]. The values of serum mucoproteins were determined by the turbidimetric method[11] in relative «thymol units» by means of the barium sulphate standard[12], applying the Clett-Summerson electrophotometer. The determination of the leucocyte and eosinophil number and of the leucocyte differential count, always prior to treatment and in killing, enabled an orientation as to the course of stress.

In mast cells of the lymph vessel and the arteriole adventitia, two types of secretion changes can be distinguished:

1. Intracellular formation of metachromatically stained vacuoles (Fig. 1) accompanied by swelling and decrease or even loss of stainability of the granules (Fig. 2).

2. Partial (Fig. 3) and total (Fig. 4) lysis of granules, identical with those which were found during the shock[4], accompanied by shrinkage of granules.

In the course of formaldehyde stress, both types of secretory changes developed. During the decrease of lymphocytes and eosinophils, i. e., in the glucocorticoid phase of stress, the formation of vacuoles took place; subsequently, during the mineralocorticoid phase (24 to 48 h)[13], lysis of granules occured. In the adrenalectomized rats, however, there was no formation of vacuoles, but in all stages of stress only lysis of granules occured, with a maximal incidence 24 h after formaldehyde injection (Fig. 5). On the other hand, in adrenalectomized cortisol-treated rats only vacuoles were formed accompanied by swelling and loss of granule stainability. The vacuoles appeared already 3 h after injection; stainability of granules was decreased to a minimum after 24 h (Fig. 6). Even after 48 h, the granules of the perivascular mast cells

[10] D. S. Kushner, K. Honig, A. Dubin, H. A. Dyniewicz, D. Bronsky, J. De La Huerga, and H. Popper, J. lab. clin. Med. *47*, 409 (1956).

[11] J. De La Huerga, A. Dubin, D. S. Kushner, H. A. Dyniewicz, and H. Popper, J. lab. clin. Med. *47*, 403 (1956).

[12] R. E. Shank and C. L. Hoagland, J. biol. Chem. *162*, 133 (1946).

[13] M. Hill, K. Dvořák and M. Pospíšil, Nature (in press).

had remained almost unstained. Equal but less intensive was the effect of cortisol in normal rats.

In the early stages, the reactions of the perivascular mast cells were, in all experimental groups, accompanied by those of the extravascular mast cells; but at 24 and 48 h the reaction was almost exclusively limited to the perivascular mast cells.

The statistically significant serum mucoprotein elevation was attained in all four groups of animals at 24 h after injection (Tab.).

Discussion. In addition to the opinions hitherto expressed[14,15,1], we believe that we may infer from our results that mast cells, besides their tissue function that can be said to be a local one, also exercise a system function by secreting substances of mucopolysaccharide nature into the circulation. Two types of morphological (secretory) changes suggest that there are at least two types of substances secreted, i. e., nonsulphated mucopolysaccharide of hyaluronate nature and sulphated mucopolysaccharide related to heparin[2–4,16]. At present, it is not possible to decide whether the secretory changes in the perivascular mast cells are the cause of, or the reaction to, the increased serum mucoproteins. Both phenomena, i. e., the mucoprotein rise[17] and the changes in the mast cells are, generally, independent from the adrenal. The demonstrated dependence of the secretion of the hyaluronate type on the adrenals indicates, however, that the adrenals are concerned with the mucopolysaccharide patterns secreted by mast cells.

M. Hill and M. Pospíšil

Institute of Biophysics, Czechoslovak Academy of Sciences, Brno, March 3, 1959.

Zusammenfassung

Es wurden bei den mit Formaldehyd oder Cortisol belasteten Ratten Sekretionsvorgänge adventitialer Mastzellen beobachtet, und zwar zur Zeit des Ansteigens der Serummukoproteine. Die Beziehungen zwischen beiden Phänomenen wurden besprochen.

[14] G. Asboe-Hansen, Internat. Rev. Cytol. *3*, 399 (1954).
[15] J. F. Riley, Pharmacol. Rev. *7*, 267 (1955).
[16] M. Hill, Exper. *13*, 395 (1957).
[17] N. F. Boas and J. B. Foley, Endocrinology *56*, 305 (1955).

Die Bedeutung konstanter Temperaturbedingungen für ERG-Untersuchungen bei Kleinsäugern

Grösse und Verlauf des Elektroretinogramms (ERG) werden durch verschiedene Versuchsbedingungen beeinflusst, von welchen neben den Reizparametern vor allem der Adaptationszustand die notwendige Beachtung findet, während die Temperatur des untersuchten Auges meist nicht kontrolliert wird. Da insbesonders bei narkotisierten Kleinsäugern mit einer beträchtlichen Auskühlung zu rechnen ist, kann eine Vernachlässigung des Temperaturfaktors schwerwiegende Messfehler verursachen.

Als Versuchstiere dienten 15 Albinoratten (männlich, 190–260 g). Die Tiere wurden 2 h vor dem Versuch narkotisiert (0,12 g/100 g Urethan intraperitoneal) und ihre Körpertemperatur bis zum Versuchsbeginn konstant gehalten (Thermostat oder Strahlungsheizung). Die rektale Messung der Kerntemperatur erfolgte mittels Cu-Konstantan-Thermoelement und Lichtzeigergalvanometer, ferner wurde in einigen Versuchen die Temperatur des linken Auges mit einem retrobulbär eingeführten feinen Thermoelement kontrolliert. Das ERG des atropinisierten und durch Lidsuturen weit geöffnet gehaltenen rechten Auges wurde mit einer durch die Cornea geführten Ag-AgCl-Drahtelektrode (0,1 mm ⌀) gegen eine paraorbitale gleichartige Bezugselektrode abgeleitet und mit Gleichstromverstärker (Tönnies), Doppelstrahl-KSO und Camera

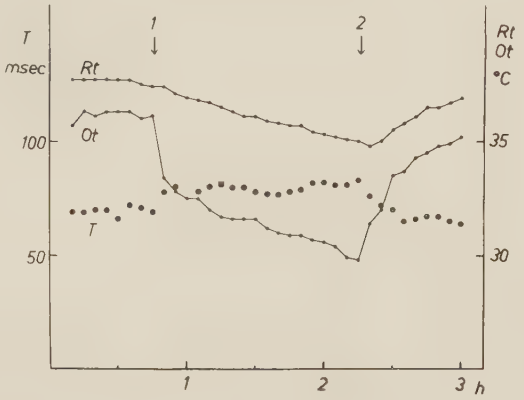


Abb. 1. Verlauf von Rektaltemperatur (*Rt*), Orbitaltemperatur (*Ot*) und Gipfelzeit der *b*-Welle (*T*) bei einem Versuchstier mit Thermoisolation von Rumpf und Extremitäten. Raumtemperatur 17°C. Zwischen 1 und 2 Strahlungsheizung ausgeschaltet. Maximale Reizintensität (100%), Helladaptation an 16 lux.

(Recordine, Tönnies) aufgenommen. Der zweite Strahl des KSO diente zur Registrierung des Lichtreizes (Reizfeld 30 cm vor dem Auge, 3 cm ⌀; Leuchtdichte maximal $3 \cdot 10^4$ cd/m² = 100%, abstufbar durch Neutralfilter; Reizdauer 25 ms). Die Temperatur des Untersuchungsraumes lag in den verschiedenen Versuchen zwischen 16,5 und 18°C, wobei ein Ventilator für konstante Luftbewegung sorgte. Über dem Tier war ein Infrarotstrahler angebracht, mit welchem das Tier erwärmt bzw. auf konstanter Temperatur gehalten werden konnte. In 3 Ver-

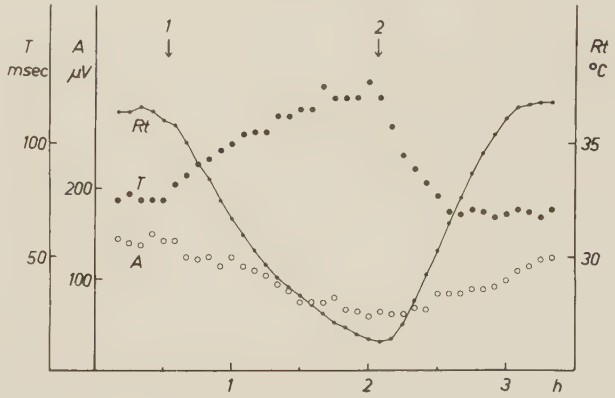


Abb. 2. Verlauf von Rektaltemperatur (*Rt*) und Amplitude (*A*) bzw. Gipfelzeit (*T*) der *b*-Welle bei vorübergehender Abschaltung der Strahlungsheizung (1: Heizung ausgeschaltet, 2: Heizung eingeschaltet). Maximale Reizintensität (100%), Helladaptation. Gleicher Versuch wie Abb. 1.

suchen wurde die Wärmeabgabe des Tieres durch Einhüllen von Rumpf und Extremitäten in Watte und wärmeisolierende Tücher reduziert. Die Versuche wurden teils bei Dunkeladaptation (Beginn nach 2 h Dunkelaufenthalt), teils bei mässiger Helladaptation (6–16 lux an Stelle des

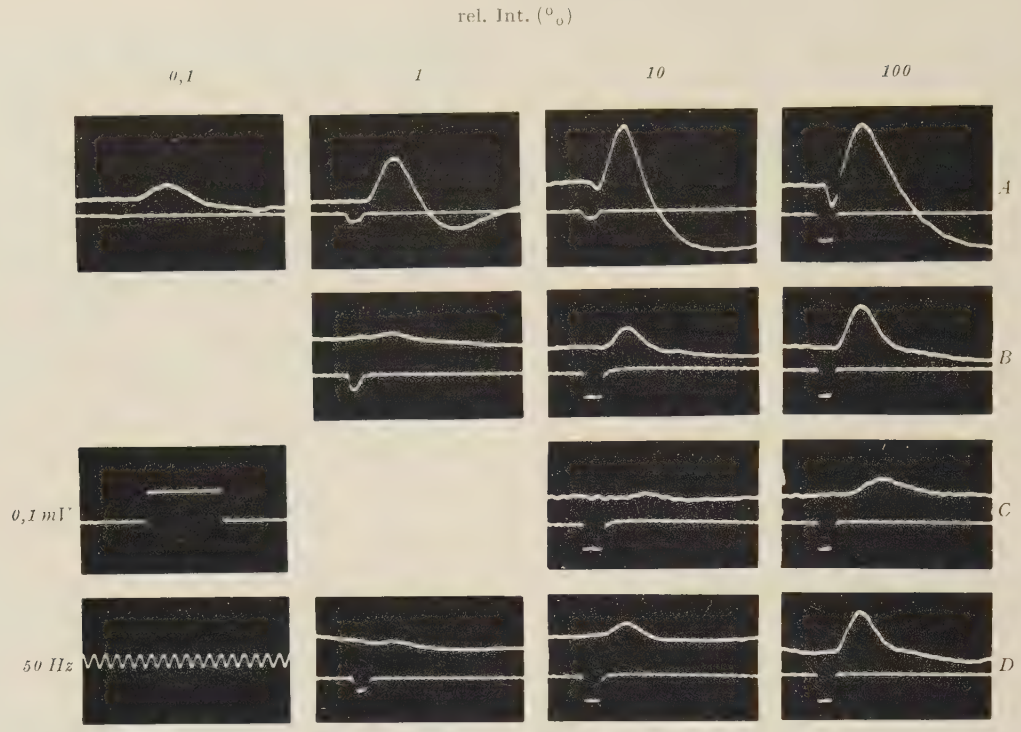


Abb. 3. ERG der Ratte bei verschiedenen Reizintensitäten nach 2 h Dunkeladaptation (*A*) bzw. während konstanter Helladaptation an 8 lux (*B*, *C*, *D*). Raumtemperatur 16,5°C. *A* und *B:* Rektaltemperatur durch Strahlungsheizung konstant gehalten. *C:* $1^1/_2$ h nach Abschaltung der Beheizung. *D:* 1 h nach neuerlichem Einschalten der Beheizung.

Auges gemessen) durchgeführt. Das ausgewertete Material umfasst 654 ERG-Aufnahmen.

Das ERG der Ratte zeichnet sich dadurch aus, dass die negative *a*-Welle und die der positiven *b*-Welle folgende negative Nachschwankung (*b'*-Welle) nur bei langdauernder Dunkeladaptation deutlich ausgeprägt sind. Hingegen besteht das ERG bei Helladaptation aus einer einfachen positiven Schwankung mit intensitätsunabhängiger Gipfelzeit (Abb. 3). Bei helladaptierten ungeschützten Tieren sank die Kerntemperatur innerhalb von 90 min auf 29,5 ± 1,5°C (7 Versuche), wodurch eine Abnahme der ERG-Amplitude sowie eine ausgeprägte Verlängerung der Gipfelzeit (um einen Faktor von 1,78 ± 0,19) verursacht wurde (Abb. 3 und 2). Es handelte sich dabei um Veränderungen des ERG, die durch eine Reduktion der Reizintensität nicht imitiert werden konnten. Bei Wiedererwärmung des Tieres mittels Strahlungsheizung kehrte das ERG zu seiner ursprünglichen Form zurück. Wurde der Versuch beim dunkeladaptierten Tier durchgeführt, so ergab sich bei fortschreitender Abkühlung ebenfalls eine deutliche Verlängerung der Gipfelzeit, wobei die positive Schwankung eine plateauartige Gestalt annehmen konnte. Da bei Dunkeladaptation der zeitliche Verlauf des ERG durch die effektive Reizintensität beeinflusst wird, deren Konstanz bei langdauernden Versuchen fraglich ist (Trübung der Cornea), erscheinen die Ergebnisse bei Helladaptation aufschlussreicher.

Die rasche Normalisierung der Gipfelzeit bei Wiedererwärmung beruht auf der in weiteren Versuchen festgestellten Tatsache, dass die Augentemperatur bei Strahlungsheizung wesentlich rascher ansteigt als die Kerntemperatur des Tieres. Wegen der exponierten Lage des Bulbus (Lidspreizung) genügte die Aufrechterhaltung einer normalen Kerntemperatur durch Schutz von Rumpf und Extremitäten nicht, um eine Auskühlung des Bulbus und daraus folgende ERG-Veränderungen zu verhüten (Abb. 1). Hingegen war es mit Hilfe der Strahlungsheizung möglich, Augentemperatur und ERG über langdauernde Versuchsperioden (4 h) konstant zu halten.

H. Bornschein und S. E. Charif

Physiologisches Institut der Universität Wien, 27. Februar 1959.

Summary

In anesthetized albino rats, the body temperature drops rapidly, causing changes in amplitude and temporal course of the electroretinogram. Normal conditions can be restored by radiating heat, whereas thermal isolation of the body was found insufficient to preserve normal temperature of the exposed eye.

Eine neue Serie wenig toxischer Lokalanästhetika aus der Xylocain-Reihe

Wir haben bereits früher gezeigt, dass die in der Synthese der Lokalanästhetika oft angewandte Alkoxy-Substitution in der Serie der basischen Carbamate[1,2] und Anilide[2,3] besonders günstig ist. Das Optimum der Wir-

[1] A. Sekera, A. Borovanský, I. Jakubec, K. Palát und Č. Vrba, Československ. farm. *5*, 388 (1956). – K. Palát, A. Sekera und Č. Vrba, Chem. listy *51*, 563 (1957); Exper. *12*, 273 (1956).

[2] A. Borovanský, A. Sekera und Č. Vrba, zum Druck vorbereitet.

[3] A. Borovanský, A. Sekera und Č. Vrba, im Druck.

Struktur und pharmakologische Wirkung der hergestellten Verbindungen

Präparat Nr.	$NHCOCH_2N(C_2H_5)_2 \cdot HCl$	Schmelzpunkt °C	Berechnet Gefunden		Relative Wirksamkeit bei		LD 50 subkutan mg/kg
			% N	% Cl	Oberflächenanästhesie	Infiltrationsanästhesie	
	$R =$						
S 250	$2\text{-}C_6H_5$	128	8,39 8,36	10,59 10,46	0,36	1,6	3150
S 251	$3\text{-}C_6H_5$	131,5	8,39 8,30	10,59 10,39	7,4	6,3	1800
S 252	$4\text{-}C_6H_5$	123	8,39 8,53	10,59 10,61	2,2	3,2	690
S 253	$2\text{-}C_6H_5CH_2$	125	8,01 8,10	10,17 10,24	0,5	1,3	4800
S 254	$3\text{-}C_6H_5CH_2$	145	8,01 8,24	10,17 10,51	3,7	4,7	940
S 255	$4\text{-}C_6H_5CH_2$	123	8,01 7,85	10,17 9,94	5,3	7,8	1100
S 256	$2\text{-}C_6H_5CH_2CH_2$	147–149	7,72 7,97	9,77 9,79	1	0,5	(6000)
S 257	$3\text{-}C_6H_5CH_2CH_2$	150	7,72 7,55	9,77 9,62	0,8	2	7200
S 258	$4\text{-}C_6H_5CH_2CH_2$	114	7,72 7,76	9,77 9,65	11	6,9	1550
Cocain					1	3,6	125
Procain					0,15	1	630
S 202 (Xylocain)					0,24	1,4	365

kung liegt gewöhnlich bei den Butoxyderivaten – niedrigere Homologe sind nur wenig wirksam, während die Salze der höheren oft in Wasserlösungen hydrolysieren. Diese Ergebnisse führten uns auf eine Reihe basischer Phenoxy-, Benzyloxy- und Phenyläthoxycarbanilate, über deren Vorbereitung und pharmakologische Eigenschaften andernorts referiert wird[4].

Auf Grund des günstigen Einflusses des Austausches der Alkoxygruppe mit dem Aroxyl bzw. Aralkoxyl auf die Aktivität und besonders auf die Erniedrigung der Toxizität, haben wir eine Serie der isomeren Phenoxy-, Benzyloxy- und Phenyläthoxy-Diäthylaminoacetanilide hergestellt und pharmakologisch geprüft.

Die Verbindungen wurden durch die von uns schon früher angewandte Methode[3] aus entsprechenden aromatischen Aminen mit Chloressigsäurechlorid und darauffolgender Überführung der entstandenen Chloracetanilide mit Diäthylamin in die betreffenden basischen Anilide verarbeitet.

Die Wirksamkeit aller Präparate wurde bei Oberflächenanästhesie (Kaninchenhornhaut, Standard Cocain M/100) und Infiltrationsanästhesie (Meerschweinchen, intradermal, Standard-Procain M/50) durch Aufsuchen und Vergleich gleichwirksamer molarer Konzentrationen dieser Stoffe mit konstanten Konzentrationen der Standardlösungen festgestellt[5,6]. Die Toxizität wurde nach KÄRBER[7] durch Bestimmung der LD 50 an weissen Mäusen des H-Stammes nach subkutaner Verabreichung ermittelt.

Die Strukturen der hergestellten Substanzen sowie die Ergebnisse der pharmakologischen Prüfungen sind aus der Tabelle ersichtlich. Es handelt sich in allen Fällen um aktive Lokalanästhetika, die grösstenteils wirksamer sind als Cocain bei Oberflächenanästhesie und Procain bei Infiltrationsanästhesie. Die Toxizität der Substanzen ist ungewöhnlich niedrig – einige Präparate zeigten sich in

[4] J. SOVA, A. SEKERA und Č. VRBA, Chem. listy *51*, 2339 (1957); Exper. *13*, 495 (1957).

[5] Č. VRBA und A. SEKERA, Arch. int. Pharmacodyn. *118*, 155 (1959).

[6] Z. ROTH, Arch. int. Pharmacodyn. *118*, 289 (1959).

[7] J. H. BURN, *Biologische Auswertungsmethoden* (Springer, Berlin 1937), p. 29.

* Gegenwärtige Adresse: Service de Chimie, Laboratoire de Pharmacologie, 21, rue de l'Ecole de Médecine, Paris VIe, France.

angewandten akuten Versuchen bis um eine Zehnerpotenz weniger toxisch als die benützte Standarde: Cocain und Procain.

A. Borovanský, A. Sekera* und Č. Vrba

Institut für pharmazeutische Chemie der Masaryk-Universität und Pharmakologisches Institut der Fakultät für Veterinärmedizin, Brno (Tschechoslowakei), 9. Februar 1959.

Summary

Local anaesthetics of low toxicity were developed from the group of aroxy- and aralkoxysubstituted diethylaminoacetanilides. The substances were tested for local anaesthetic activity in surface and infiltration anaesthesia and for toxicity.

DISPUTANDUM

Erwiderung zum Beitrag von F. B. Klynstra, Experientia *14*, 437 (1958).

A Contribution to the Problem of the Haem-Protein-Linkage in Haemoglobin

In einer kurzen Mitteilung berichtete Klynstra über starke Veränderungen der O_2-Dissoziationskurve des menschlichen Hämoglobins bei Zusatz von Histidin und zog hieraus erhebliche Rückschlüsse auf die Gleichgewichte des Hb, bzw. entwickelte sogar theoretische Vorstellungen über die Anordnung der Hämgruppen im Molekül. Wir haben nun vor einiger Zeit Untersuchungen über die O_2-Dissoziationskurve des Hb hinsichtlich einer Beeinflussung durch Komplexbildner des Fe(2) angestellt, unter anderem untersuchten wir zum Beispiel auch HCN bzw. Imidazol. Wir konnten in Gegenwart hoher Konzentrationen dieser beiden Moleküle keine Veränderung der O_2-Bindungskurve des Hb – weder hinsichtlich der Form noch Lage der Kurve – beobachten (unveröffentlicht).

Umso erstaunter waren wir über die starke Veränderung der HbO_2-Dissoziationskurve, die Klynstra in Gegenwart von Histidin erhielt. Wir prüften deshalb seine Ergebnisse – allerdings mit Rinder-Hb – nach. Die Ergebnisse sind tabellarisch zusammengestellt. Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist Histidin im untersuchten Konzentrationsbereich *nicht* in der Lage, die O_2-Dissoziationskurve des Hb signifikant zu verändern. Unser primär gehegter Verdacht, dass Klynstra den altbekannten Bohr-Effekt auf dem Umweg über das Histidin(di)hydrochlorid neu entdeckt hat, dürfte damit bestätigt sein. Vermutlich hat Klynstra übersehen, dass die Pufferkapazität eines 1/15 *M* Phosphatpuffers (pH 7,38) bzw. einer $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ *M* (?) Hb-Lösung nicht ausreicht, um 10^{-2} bzw. 10^{-1} *M* Konzentration von Histidindihydrochlorid abzupuffern. Messungen des pH-Wertes der Endansätze wurden von ihm nicht ausgeführt.

Um noch den Einwand auszuschalten, dass wir nicht mit Menschen-, sondern mit Rinder-Hb gearbeitet hatten und möglicherweise Speziesdifferenzen bestehen könnten, wurde ein Differenzspektrum zwischen menschlichem HbO_2 bei Abwesenheit und Anwesenheit von Histidin aufgenommen. Es zeigten sich auch hierbei keine Unterschiede in der Lichtabsorption, obwohl nach Klynstra eine Verdrängung des O_2 durch Histidin hätte erfolgen müssen (Versuchsbedingungen: [Hb(2)] = $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ val; [Histidin] $5 \cdot 10^{-2}$ *M*; pH = 7,6; t = 20°C; Bereich = 450–680 mμ).

Die theoretischen Schlussfolgerungen von Klynstra, zum Beispiel, dass 1 Molekül Histidin 2 Moleküle O_2 verdrängt, oder dass die Häme mit einer einzelnen Imidazolgruppe des Proteins verknüpft sind, erscheinen auf Grund unserer negativen Befunde im rechten Licht.

W. Scheler und W. Schwartzkopff-Jung

Deutsche Akademie der Wissenschaften, Institut für Medizin und Biologie, Berlin-Buch, Arbeitsbereich Pharmakologie, 9. März 1959.

Zur Erwiderung der Kritik von Scheler und Schwartzkopff-Jung diene das Folgende:

Das Nicht-Ausführen von pH-Messungen der Endansätze war eine Unterlassungssünde, wofür ich mich als Vorstand der Abteilung, an der Klynstra arbeitete, persönlich mitverantwortlich fühle.

Dabei ist noch ein Zweites hervorzuheben: das sichtbare Absorptionsspektrum des Hämoglobins ändert sich nicht oder kaum nach Hinzufügung des Histidins. Bei einer Komplexbindung des Histidins am Eisen würde man eine derartige Änderung erwarten.

Andererseits ist es meines Erachtens doch zweifelhaft, ob der Einfluss des Histidins auf das Hb/O_2-Gleichgewicht

Beeinflussung der O_2-Dissoziationskurve des Rinderhämoglobins durch Histidin

Phosphatpuffer 1/15 *M* (pH 7,4), Temperatur = 20,5°C. Die Analyse der O_2-Bindung an Hb erfolgte spektralphotometrisch gemäss $y = 100 \times (E_x - E_{Hb})/(E_{HbO_2} - E_{Hb})$, die Gasanalyse mittels Haldanescher Apparatur.

E_x = Extinktion der unbekannten Lösung, E_{Hb} = Extinktion des reduzierten Hb, E_{HbO_2} = Extinktion des Oxyhämoglobins.

[Histidin] = 0 *M*; [Hb(2)] = $3{,}32 \cdot 10^{-3}$ val; pH = 7,52; n = 2,80; log pO_2 50% = 0,83		[Histidin)] = 10^{-2} *M*; [Hb(2)] = $3{,}24 \cdot 10^{-3}$ val; pH = 7,67; n = 2,85; log pO_2 50% = 0,81		[Histidin] = $\sim 10^{-1}$ *M*; [Hb(2)] = $3{,}28 \cdot 10^{-3}$ val; pH = 7,57; n = 2,50; log pO_2 50% = 0,82	
log pO_2 [mm Hg]	% HbO_2 (y)	log pO_2 [mm Hg]	% HbO_2 (y)	log pO_2 [mm Hg]	% HbO_2 (y)
0,44	11,8	0,59	18,6	0,50	15,3
0,72	27,8	0,77	48,3	0,65	28,8
0,79	42,4	0,81	52,3	0,77	46,3
0,96	66,7	1,03	78,5	0,98	70,7
1,12	88,2	1,14	87,3	1,12	83,1
1,23	95,8	1,26	94,2	1,28	93,2

ohne weiteres auf den Bohr-Effekt zurückzuführen sei. Erstens tritt eine auffällige Formänderung der Kurve auf, die beim einfachen Bohr-Effekt (auch in stark verdünnten Lösungen) fehlt. Zweitens ist der Histidin-Effekt, wie aus der Abbildung hervorgeht, am stärksten bei den niedrigen Konzentrationen, wo die pH-Verschiebung relativ gering sein muss. Da die Beziehung zwischen pH und t_{O_2} (50%) zwischen pH 7,50 und 6,50 bei menschlichem Hämoglobin linear ist (auch für verdünnte Hb-Lösungen!), würde man für den Einfluss des Histidins auf die Lage der Dissoziationskurve eine andere Beziehung erwarten, als in KLYNSTRAS Kurve in Erscheinung tritt. Selbstverständlich werden neue Experimente mit menschlichem Hämoglobin hier entscheiden müssen. KLYNSTRAS bisherige Versuche lassen weitgehende theoretische Schlussfolgerungen nicht zu.

H. P. WOLVEKAMP

Zoologisches Institut, Leiden, 3. April 1959.

Da der Hauptanlass zum vorausgehenden *Disputandum* die detaillierten theoretischen Überlegungen von F. KLYNSTRA waren und diese in ihren weitgehenden Schlussfolgerungen auch von Herrn Prof. WOLVEKAMP zurückgenommen wurden, können wir jetzt Schluss der Diskussion erklären. *M*

A Method for Purifying Rat Myoglobin for Kinetic Studies[1]

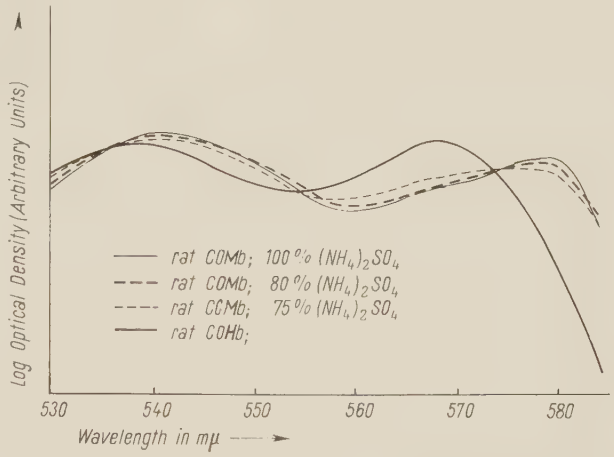
Recent investigations dealing with the functional role of myoglobin (Mb) during altitude acclimatization of rats necessitated the preparation of freshly purified Mb for use in kinetic studies[2]. While the chemistry of Mb obtained from other mammalian species has been adequately investigated[3,4], very little information is available on the purification of rat Mb[5].

The present report describes a relatively simple method for obtaining pure rat Mb which can be used for kinetic measurements. It is based on a procedure originally described by THEORELL[6] for purifying horse Mb.

The steps in the purification are as follows:

(1) Muscle obtained from rats is crushed while frozen in dry ice and the Mb is extracted with an equal volume of distilled water[7]. The extract is adjusted to pH 7·0 with 0·1 *M* NaOH.

(2) Extraneous proteins are then precipitated by the dropwise addition of saturated basic lead acetate ($^1/_4$ volume of solution to 1 volume of extract). After discarding the precipitate the excess lead ions are precipitated from the extract by the addition of a slight excess of Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4. During precipitation, the pH is carefully maintained between 7 and 8. After centrifugation, the precipitate is discarded; the supernatant is readjusted to pH 7·0 and bubbled with carbon monoxide.



Comparison of the absorption spectra of rat COMb extracts (after dialysis against different saturations of ammonium sulfate solutions) with that of rat COHb. All solutions were in *M*/15 phosphate buffer, pH 7·8.

(3) Having converted the Mb to carbonylmyoglobin (COMb)[8], the extract is dialyzed against 60% saturated $(NH_4)_2SO_4$, pH 7·0, for 18 h. Next the resulting precipitate is centrifuged down; the supernatant is reconverted to COMb and dialyzed against 80% saturated $(NH_4)_2SO_4$, pH 7·0, for 12 h[9]. The light red precipitate contains all spectroscopically detectable hemoglobin, some Mb, and other proteins. The precipitate is removed by centrifugation at 14000 *g*.

(4) The supernatant is converted to COMb and dialyzed against *M*/15 K_2HPO_4. After 12 h of dialysis the purified extract contains O_2Mb with a minimal amount of metmyoglobin.

On a number of occasions attempts were made to form O_2Mb by oxygenation of either reduced Mb or COMb. The oxygenation of reduced Mb was unsatisfactory since it consistently resulted in the formation of much metmyoglobin. In contrast, the oxygenation of COMb sometimes yielded pure O_2Mb, though generally some metmyoglobin was also present. The latter method was not used since it was more time consuming than the dialysis method and usually gave only slightly less metmyoglobin contamination.

The unstable nature of Mb necessitates that it be purified as quickly as possible and that the purified solutions be used for kinetic measurements within a few hours after preparation. After storing Mb at 5°C for a few days, metmyoglobin could not be converted to O_2Mb.

The purification of Mb for kinetic experiments necessitates the removal of any protein impurity which might influence the measurement of the reaction rates. Hemoglobin and cytochrome *c* are probably the only protein impurities that would interfere with measurements of O_2Mb kinetics. The absence of a band at 550 mμ (Figure) shows that cytochrome *c* was not present in the purified solutions.

[1] This research was aided by the U.S. Air Force School of Aviation Medicine, Randolf AFB, under contract AF 18(600)-940 and the National Institutes of Health under grant RG-5112(Rl). This is paper No. 2342 in the Pennsylvania Agricultural Experiment Station.

[2] G. K. STROTHER, E. ACKERMAN, A. ANTHONY, and E. H. STRICKLAND, Amer. J. Physiol. *196*, 517 (1959).

[3] H. THEORELL, Biochem. Z. *268*, 73 (1934).

[4] A. ROSSI-FANELLI and E. ANTONINI, Exper. *13*, 477 (1957).

[5] A. ROSSI and C. ARAGONA, Boll. Soc. ital. Biol. sper. *17*, 206 (1942).

[6] A. H. T. THEORELL, Biochem. Z. *252*, 1 (1932).

[7] *Mb* must be kept around 0–10°C throughout the purification. On several occasions when *Mb* solutions warmed to 25°C for several hours, changes were detected in the 530–585 mμ region of the COMb spectrum.

[8] During purification Mb should be kept as COMb, which seems to be less susceptible to denaturation than O_2Mb. In order to form COMb, a pinch of $Na_2S_2O_4$ is added to the solution after it has been saturated with CO.

[9] The 80% saturated $(NH_4)_2SO_4$ should have a specific gravity of at least 1·205 at 25°C to assure removal of hemoglobin.

The absence of spectrally detectable hemoglobin after the 80% saturated $(NH_4)_2SO_4$ dialysis was established in the following way. In the region 530 mμ to 585 mμ, carbonyl hemoglobin (COHb) and COMb have different absorption spectra so that a change in the percentage of COHb in the solution results in changes in the absorption spectrum of the mixture. If the log optical density (OD) is plotted against wavelength in the 530–585 mμ region, the shape of the curve will depend only on the percentages of each absorbing component present. From the Figure it can be seen that after the 80% saturated $(NH_4)_2SO_4$ dialysis the percentages of COHb and COMb remained unchanged upon dialysis against more saturated $(NH_4)_2SO_4$ solutions. Since hemoglobin starts to precipitate at a lower ionic strength than Mb, it is probable that the curves obtained from the supernatant after the 80% and 100% saturated dialysis were identical because all spectroscopically detectable hemoglobin was removed.

Although the above procedure yielded purified Mb extracts which proved suitable for kinetic experiments, several additional attempts were made to carry the purification one step further by crystallizing Mb. The purified Mb solution was fractionated against more concentrated $(NH_4)_2SO_4$. After several days the resulting precipitate contained particles which resembled the globuliform crystals described by Rossi-Fanelli *et al.*[10]; however, no macroscopic crystals were obtained on continuing the dialysis for six weeks.

Following the failure to obtain crystalline Mb by $(NH_4)_2SO_4$ fractionation, the samples obtained after step 3 in the above procedure were chromatographed on Amberlite IRC 50. Some non-chromoprotein contaminants were separated by this ion exchange resin. The results of this exploratory investigation are supported by similar findings for Mb from other animal species[11] and suggest that ion exchange chromatography may be used for further purification. An additional method of Mb purification which merits consideration is continuous paper electrophoresis, which was recently used in purifying fish Mb[12]. However, it is our belief that the dialysis technique described in the present report is simpler and more likely to yield larger amounts of Mb which can be used in spectroscopic measurements of kinetic reactions.

E. H. Strickland, A. Anthony, and E. Ackerman

Biophysics Laboratories, Pennsylvania State University, University Park (Pennsylvania), February 26, 1959.

Résumé

Une technique est décrite pour préparer de la myoglobine pure par fractionnement avec sulfate d'ammonium.

[10] A. Rossi-Fanelli, D. Cavallini, and C. DeMarco, Arch. Biochem. Biophys. *50*, 496 (1954).

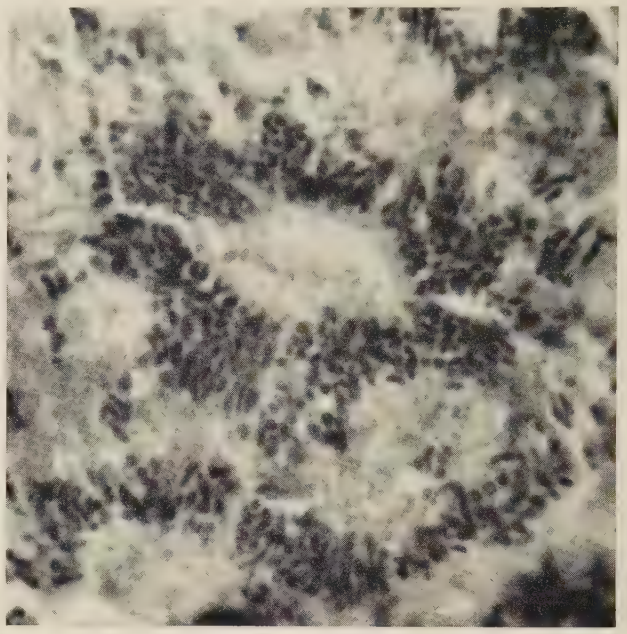
[11] N. K. Boardman and G. S. Adair, Nature *177*, 1078 (1956). – R. Trimmer, H. J. Van der Helm, and T. H. J. Huisman, Nature 180, 239 (1957).

[12] E. Antonini and B. Mondovi, Boll. Soc. ital. Biol. sper. *31*, 1388 (1955).

PRO EXPERIMENTIS

Rapid Staining of Mitochondria

Several methods have, up till now, been suggested for the demonstration of mitochondria in permanent mount tissues; but most of them, requiring special fixatives, mordants and lenght of time, are not suitable for routine laboratory work.



Mitochondria in hepatic cells of Guinea pig (× 1500).

I have obtained excellent results with the following rapid and simple method, and I advice it not only for routine but also for special histological study (pathological changes as cloude swelling, and so on).

Fixation: fix exclusively in 10% formalin. Embed in paraffin.

Method of staining

(1) After removal of the paraffin in the usual way, rinse in water and place the sections into a warm normal solution of hydrochloric acid (about 60°C) for 3 min.
(2) Rinse in water.
(3) Place the sections in fuchsin acid aqueous solution 1% for 30 sec.
(4) Rinse in water.
(5) Place the sections in light green aqueous solution 1% for 1 to 3 min.
(6) Rinse in water.
(7) Dehydrate in 95% and absolute alcohol.
(8) Clear in xylol and mount in balsam.

Mitochondria stand out sharply, stained purple-red with peripheral wall green, chromatin and collagen green, muscle tissue purplish, erythocites brilliant red.

A. Novelli

Department of General Pathology of the University of Genova (Italy), March 6, 1959.

Riassunto

Viene descritta una nuova semplice tecnica per la colorazione rapida dei mitocondri nelle sezioni di tessuti: i pezzi devono essere fissati in formalina, le fettine, dopo sparaffinamento, vengono immerse in una soluzione calda (60°C) di acido cloridrico normale per 3 min e poi colorate con fucsina acida (1%) per 30 sec e con verde luce (1%) per 1–3 min. I mitocondri risaltano intensamente colorati in rosso con una sottile parete colorata in verde.

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

COGITATIONES

Experimentelle Feststellung dualer Potentiale an intra-nicht-permutierenden Membranen

Von W. Kuhn, H. J. Kuhn, D. H. Walters, H. Majer und H. Eglin[1]

In einer vor kurzem erschienenen Arbeit von Kuhn und Ramel[2] ist gezeigt worden, dass nicht *ein* Potential, sondern *zwei*, der Grösse und in vielen Fällen auch dem Vorzeichen nach voneinander *verschiedene* Potentiale auftreten können oder *müssen*, wenn zwei Lösungen verschiedener Zusammensetzung durch eine ionendurchlässige, Ionen-intra-nicht-permutierende Membran voneinander getrennt sind. Das eine oder das andere der beiden Potentiale muss auftreten, je nachdem die in der Membran vorhandenen Poren von der einen oder von der andern der beiden mit der Membran in Berührung stehenden Lösungen her mit Ionen (im Falle einer kationendurchlässigen, Kationen intra-nicht-permutierenden Membran mit Kationen) gefüllt worden sind. Die Füllung von der einen oder andern Seite her ist beispielsweise durch Aufrechterhaltung eines – gegebenenfalls sehr *schwachen* – Stromtransportes in bestimmter Richtung möglich.

Es wurde darauf hingewiesen, dass diese beiden möglichen, bei einer Membran auftretenden Potentiale im Falle der Nerven- und der Muskelmembran mit dem Ruhe- und Aktionspotential zu identifizieren sind. Weiter wurde gezeigt, dass die Umstellung einer solchen Membran vom einen Potential auf das andere in einfacher Weise erzwungen werden kann und dass damit dieWirkung des elektrischen Organs von Fischen sowie die Reizleitung des Nerven verständlich wird.

Überdies ergaben sich einfache und zwingende Beziehungen zum *aktiven Ionentransport.*

In Anbetracht der Wichtigkeit dieser Folgerungen haben wir uns bemüht, eine kationendurchlässige, Kationen bis zu einem gewissen Grade intra-nicht-permutierende Membran *künstlich* herzustellen und womöglich die Dualität der an einer solchen Membran auftretenden Potentiale experimentell festzustellen. Über die Herstellung einer solchen Membran und die an ihr beobachtete Dualität der Potentiale wird nachstehend berichtet.

Herstellung einer kationendurchlässigen, intra-schlecht-permutierenden Membran. Es wurden 0,25 Gewichtsteile von zu 60% mit NaOH neutralisierter Polyacrylsäure $(CH_2 \cdot CHCOOH)_x$ auf 100 Gewichtsteile Polyvinylalkohol $(CH_2 \cdot CHOH)_x$ in Wasser gelöst. Die wässerige Lösung wurde auf eine Plexiglasplatte ausgegossen und eintrocknen gelassen. Die so entstehende Folie wurde von der Glasplatte abgezogen und durch Anbringen eines passenden Gewichtes bei 100 bis 110°C auf etwa das 5fache der zunächst vorhandenen Länge gestreckt. Die gestreckte Folie wurde unter Konstanthaltung der Länge bei 25°C während 24 h in eine Formaldehyd (CH_2O)-Dampf und HCl-Dampf enthaltende Atmosphäre gebracht. Durch die Einwirkung des Formaldehyds in Gegenwart von Salzsäure wird der Polyvinylalkohol in ein dichtes, in Wasser *sehr* wenig quellbares Netzwerk verwandelt, in welchem die Moleküle der Polyacrylsäure in der *Dehnungsrichtung der Folie orientiert und in dieser Orientierung unbeweglich eingebettet* sind.

Die der Fadenachse der Polyacrylsäure entlang vorhandenen COOH- oder COO^--Gruppen bilden eine in der Dehnungsrichtung der Folie liegende Reihe, gewissermassen eine *Pore*, in welche Kationen, also K^+- oder Na^+-Ionen eintreten, in welcher sie sich in der Längsrichtung verschieben, innerhalb welcher sie aber nicht so leicht miteinander Platz wechseln können. Dass eine solche Intra-Nicht-Permutierbarkeit bis zu einem gewissen Grade verwirklicht sein dürfte, wird durch die Beobachtung nahe gelegt (wenn auch noch nicht streng bewiesen), dass der Ohmsche Widerstand einer quadratischen, aus einer solchen Folie geschnittenen Probe parallel zur Dehnungsrichtung um 10 bis 20% niedriger ist als senkrecht zur Dehnungsrichtung.

Duales Potential. Ein schmaler Streifen einer solchen Folie wurde nun zwischen Plexiglasplatten so gefasst und von rechts und links her je mit einer $n/10$ Lösung von KCl bzw. NaCl, welche pro Liter $^1/_{10}\,M$ KCl + $10^{-4}\,M$ NaCl bzw. $^1/_{10}\,M$ NaCl + $10^{-4}\,M$ KCl enthielt (diese Lösungen werden im folgenden der Kürze halber nach ihrem Hauptbestandteil als $n/10$ KCl bzw. als $n/10$ NaCl bezeichnet) in Berührung gebracht, wobei diese Lösungen während des Versuchs nach Belieben gewechselt werden konnten, und so, dass beim Stromdurchgang durch die Folie eine Bewegung der in der Folie enthaltenen K- bzw. Na-Ionen in der Richtung, in welcher die Folie gedehnt worden war, erfolgte (Abb. 1).

In einem ersten Versuch wurde die Folie, bevor sie in der angedeuteten Weise verwendet wurde, während 24 h in $n/100$ NaOH-Lösung, nachher in eine $n/10$ NaCl-Lösung gelegt, so dass die Neutralisation der in der Folie vorhandenen Polyacrylsäure mit Na^+-Ionen gewährleistet war. Zunächst wurden zu beiden Seiten der Folie $n/10$

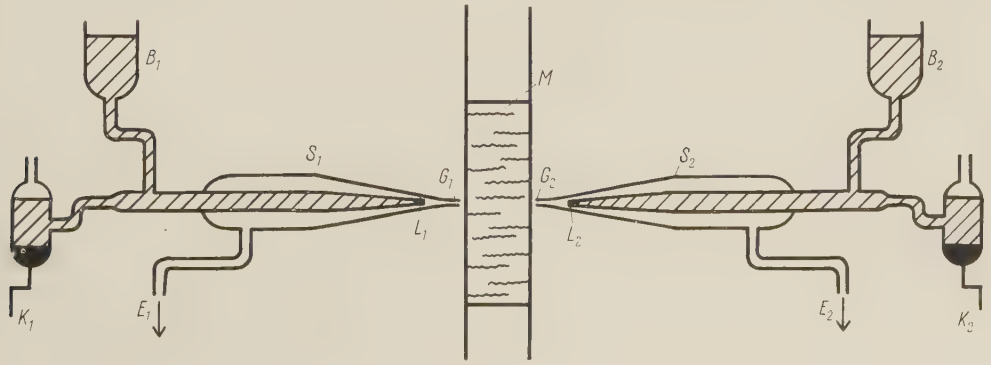


Abb. 1

[1] Physikalisch-chemisches Institut der Universität Basel.

[2] W. Kuhn und A. Ramel, Helv. chim. Acta *42*, 293 (1959).

NaCl-Lösungen angebracht. Es wurde ein schwacher Strom von links nach rechts durch das System geschickt. [mit Hilfselektroden (Kalomelelektroden), die in Abb. 1 nicht eingetragen sind.] Das Potentialgefälle an der Membran mit und ohne Stromdurchgang wurde mit Hilfe von speziellen Sonden S_1 und S_2, deren Bau aus Abbildung 1 ersichtlich ist und welche an gesättigte Kalomelelektroden K_1 bzw. K_2 angeschlossen waren, gemessen. Dadurch, dass – im Falle der Sonde S_1 – ein schwacher Flüssigkeitsstrom aus der Lösung I durch die Spitze der Kapillare G_1 angesaugt und an L_1 vorbei nach E_1 geleitet und dort aus der Apparatur entfernt wurde und dadurch, dass gesättigte KCl-Lösung in *sehr* schwachem Strom aus dem Behälter B_1 durch das Rohr S_1 und durch die mit Asbestfasern nahezu verschlossene Mündung der Kapillare L_1 geschickt wurde, wurde erreicht, dass das zwischen G_1 und G_2 bestehende Potential gemessen werden kann, 1. *ohne* dass K-Ionen von der aus L_1 austretenden konzentrierten KCl-Lösung an die Stelle G_1 gelangen, dass also bei G_1 die Ionenkonzentration streng definiert bleibt, und 2., dass bei L_1 ein gut definiertes Potential der dort heraussickernden gesättigten KCl-Lösung gegen die an L_1 vorbeiströmende Lösung I vorhanden ist.

In einem besonderen Versuch, in welchem bei E_1 eine mit $n/10$ NaCl bzw. $n/10$ KCl bereitete Kalomelelektrode angebracht wurde, haben wir uns davon überzeugt, dass das Diffusionspotential der in L_1 (bzw. L_2) vorhandenen *gesättigten* KCl-Lösung gegen eine dort vorbeiströmende $n/10$-NaCl- bzw. $n/10$-KCl-Lösung auf Bruchteile eines Millivolts *identisch* ist, so dass sich die bei L_1 und L_2 auftretenden Teilpotentiale bei den eigentlichen Messungen in allen Fällen kompensieren.

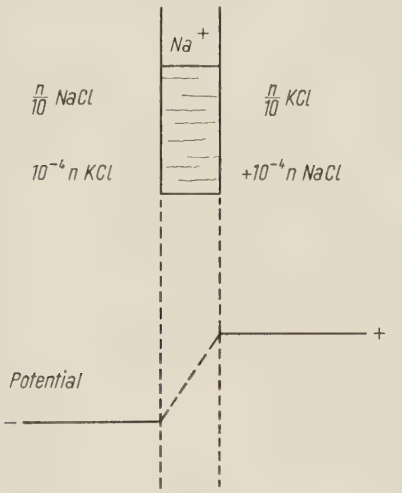


Abb. 2

Nachdem das an der Membran auftretende Potential unter den beschriebenen Bedingungen (das heisst dann, wenn $n/10$ NaCl sowohl links wie rechts der Membran eingesetzt war) gemessen und konstant befunden war, wurde die auf der rechten Seite der Membran vorhandene $n/10$-NaCl-Lösung durch $n/10$ KCl ersetzt. Es trat jetzt eine Potentialverschiebung um 5 mV ein, wobei die auf der Anodenseite vorhandene NaCl-Lösung ein *negatives* Potential gegen die KCl-Lösung annahm (Abb. 2).

Dieses Potential (NaCl-Lösung um 5 mV *negativ* gegen die KCl-Lösung) bleibt, wenigstens während einiger Zeit, auch erhalten, wenn die Stromstärke des durch die Anordnung geschickten Stroms auf Null reduziert, das heisst, wenn das Potential im stromlosen Zustand der Anordnung gemessen wird. Diese Versuchsanordnung und das Ergebnis ist in Abbildung 2 veranschaulicht.

In einem weiteren Versuch wurde ein Stück derselben Folie anstatt mit NaOH mit KOH neutralisiert. Anschliessend wurde sowohl rechts als links der Membran je eine $n/10$-KCl-Lösung angebracht, das Potential bei schwachem Stromdurchgang von rechts nach links durch die Membran festgestellt und anschliessend die auf der *linken* Seite der Membran befindliche KCl-Lösung durch $n/10$ NaCl ersetzt. Anordnung Abbildung 3. Hier wurde beim Ersatz der auf der linken Seite der Membran befindlichen KCl-Lösung durch NaCl wiederum eine Potentialänderung festgestellt, jetzt aber in dem Sinne, dass die rechts der Membran befindliche Lösung (die KCl-Lösung) um 5 mV *negativ* gegen die links der Membran befindliche Lösung (gegen die NaCl-Lösung) wurde. Auch dieses Potential (KCl-Lösung negativ gegen die NaCl-Lösung) bleibt, wenn das Potential im stromlosen Zustand der Anordnung gemessen wurde, bestehen.

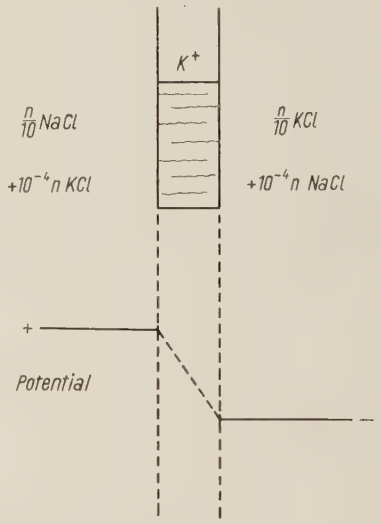


Abb. 3

Beim ersten Versuch kann die rechts der Membran, beim zweiten die links der Membran befindliche Lösung beliebig oft gewechselt, das heisst, $n/10$ KCl durch $n/10$ NaCl ersetzt werden und umgekehrt. Es wird stets, wenn bei Versuch 1 beiderseits der Membran $n/10$ NaCl und bei Versuch 2 beiderseits der Membran $n/10$ KCl vorgelegt wird, bei der stromlosen Anordnung ein Potential 0, bei der Anordnung Abbildung 2 und bei der Anordnung Abbildung 3 dagegen das bei diesen Abbildungen nach Grösse und Vorzeichen angegebene Potential in reproduzierbarer Weise erhalten. Vorauszusetzen ist, dass der gegebenenfalls auf die Stromstärke Null herabgesetzte Strom beim Versuch 1 (Abb. 2) nur von rechts nach links, beim Versuch 2 (Abb. 3) nur von links nach rechts durch die Anordnung geschickt wird.

Es ist damit, soviel uns bekannt ist, *erstmals* erwiesen, dass bei Benutzung derselben Lösungen und derselben künstlichen Membran in derselben Anordnung (Abb. 2 und Abb. 3) 2 zueinander entgegengesetzt gerichtete Potentiale auftreten, je nachdem die intra-schlechtpermutierende Membran von der einen oder von der andern der an sie angrenzenden Lösungen her mit Ionen versorgt wurde.

Dass die NaCl-Lösung in Anordnung Abbildung 2 (Polyacrylsäure in der Membran mit Na^+-Ionen neutralisiert) negativ gegen die KCl-Lösung ist, steht in Übereinstimmung mit dem, was auf Grund der eingangs zitierten Arbeit erwartet werden muss: Bei Stromdurchtritt von links nach rechts werden Na-Ionen aus einer Lösung, in welcher eine hohe Na-Ionenkonzentration (0,1 Val/l) vor-

liegt, in eine Lösung gebracht, in welcher eine kleine Na-Ionenkonzentration (10^{-4} Val/l) vorliegt. In entsprechender Weise steht die Feststellung, dass in Abbildung 3 die KCl-Lösung negativ gegen die NaCl-Lösung ist, mit der Feststellung in Übereinstimmung, dass bei Stromdurchgang von rechts nach links in Abbildung 3 K-Ionen aus einer an K-Ionen reichen in eine an K-Ionen arme Lösung transportiert werden. Das Vorzeichen und die sonstigen Bedingungen bei Abbildung 3 entsprechen dem Ruhepotential beim Nerv und beim Muskel, während Bedingungen und Spannungsvorzeichen bei Abbildung 2 dem Aktionspotential beim Nerv und beim Muskel entsprechen.

Ein *Unterschied* bei der Anordnung von Abbildung 2 und 3 gegenüber dem Nerv und dem Muskel besteht im *Absolutwert* der beobachteten Potentiale. Die Absolutwerte sind bei unserer künstlichen Membran rund 10mal kleiner als die entsprechenden, beim Nerv und beim Muskel beobachteten Potentiale. Die Kleinheit der beim künstlichen System beobachteten Absolutwerte ist deswegen zu erwarten, weil die beschriebenen künstlichen Membranen nicht streng intra-nicht-permutierend sind. Dass eine gewisse Intra-Permutation bei unseren Membranen sicher vorliegt, geht schon daraus hervor, dass die Leitfähigkeit in der Dehnungsrichtung, wie mitgeteilt wurde, nur um 15% grösser als senkrecht dazu ist.

Anderseits ist das Auftreten entgegengesetzt gerichteter, ungefähr gleich grosser Potentiale in Abbildung 2 und 3 *nicht* selbstverständlich. Tatsächlich konnte in zu Abbildung 2 und 3 analogen Versuchen ein duales Potential *nicht* beobachtet werden, wenn anstatt einer 0,25% Polyacrylsäure enthaltenden, eine sonst gleich hergestellte Membran mit einem Polyacrylsäuregehalt von 10% verwendet wurde. Offenbar ist bei dieser hinsichtlich Alkali-Polyacrylat *konzentrierteren* Membran die Bedingung Kationen-intra-nicht-permutierend zu sein, schlechter erfüllt als bei an Alkali-Polyacrylatarmen Membranen. Offenbar sind nur oder besonders bei den letzteren Membranen den orientierten Polyacrylatketten entlang von einander isolierte lineare Strombahnen vorhanden.

Ebenso wurde in derselben Anordnung *kein* duales Potential festgestellt, wenn eine 0,5% Polystyrolsulfosäure enthaltende homogene (nicht durch Strecken anisotrop gemachte) im wesentlichen aus Nitrozellulose bestehende Folie als Membran verwendet wurde.

Das Gesamtergebnis der Versuche ist die Feststellung, dass duale Potentiale auftreten, jedoch nur an solchen Membranen, bei welchen auf Grund der besonderen Struktur eine gewisse Intra-Nicht-Permutierbarkeit der in der Membran enthaltenen Ionen vorauszusehen ist*.

Thermodynamische Besonderheit der intra-nicht-permutierenden Membranen. Das Auftreten von dualen Potentialen an intra-nicht-permutierenden Membranen ist eine thermodynamische Besonderheit, auf welche kurz hingewiesen sei. Nehmen wir für den Augenblick, so wie das[2] geschehen ist, an, dass eine streng intra-nicht-permutierende Membran gegeben sei. Wenn wir in solchem Falle auch nur den kleinsten Strom stationär von links nach rechts durch die Anordnung Abbildung 1 hindurchschicken, erhalten wir einen Transport von Na^+-Ionen von hoher nach niedriger Konzentration und ein Potential gemäss Abbildung 2; lassen wir umgekehrt einen unendlich schwachen Strom von rechts nach links durch dieselbe Anordnung hindurchtreten, so erhalten wir einen Transport von K^+-Ionen von hoher nach niedriger Konzentration und ein Potential gemäss Abbildung 3; tragen wir somit die von links nach rechts durch die Anordnung Abbildung 1 stationär fliessende Stromstärke i als Abszisse und das Potential der Lösung II gegen Lösung I als Ordinate auf, so erhalten wir das Bild Abbildung 4 mit einer scharfen Unstetigkeit bei $i = 0$.

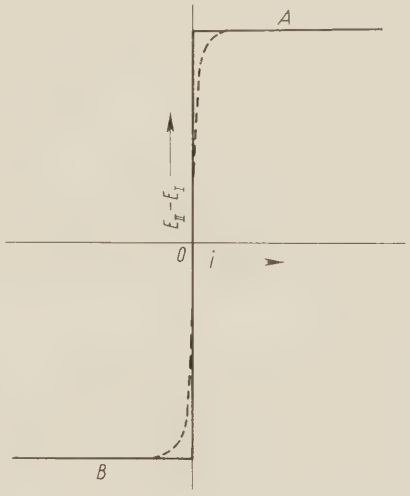


Abb. 4

Nun setzt schon die Definition und Messung eines Potentials mit Hilfe der Anordnung Abbildung 1 die Erzeugung einer kleinen Variation der zwischen den Elektroden K_1 und K_2 bzw. zwischen G_1 und G_2 bestehenden *Spannung* und damit eine kleine Variation des von G_1 nach G_2 fliessenden (zum Beispiel auf Null zu kompensierenden) Stromes voraus. Die Unstetigkeit bei $i = 0$ in Abbildung 4 hat daher zur Folge, dass bei einer wirklich intra-nicht-permutierenden Membran bei $i = 0$ überhaupt keine Messung möglich sein sollte, indem die bei der Messung vorzunehmende Variation des von aussen angelegten Potentials bereits eine «Erregung» des Systems, das heisst einen Übergang von Ast A zu Ast B von Abbildung 4 (Zustand Abb. 2 in Zustand Abb. 3) oder umgekehrt zur Folge haben muss. Praktisch wird diese Unstabilität, wie schon [2] angedeutet wurde, durch die Stoffkapazität der Mündungszonen der in der Membran vorhandenen Kapillaren, sowie durch die Stoffkapazität des Inhaltes der Membrankapillaren gemildert und sodann auch dadurch, dass es streng intra-nicht-permutierende Membranen voraussichtlich nicht geben wird. Die Schwierigkeit, auf künstlichem Wege auch nur einigermassen intra-nicht-permutierende Membranen herzustellen, deutet in dieser Richtung. In solchem Falle ist der Linienzug in Abbildung 4 durch eine stetige, steil verlaufende, scharf abbiegende S-Kurve zu ersetzen (gestrichelte Kurve in Abb. 4).

Auch wenn wir dies alles berücksichtigen, stellen wir fest, dass wir uns bei der Messung von Potentialen an intra-nicht-permutierenden Membranen häufig in *labilen* Bereichen befinden. Wir möchten es für wahrscheinlich halten, dass es sich bei den beim Gehirn festgestellten periodischen Spannungsschwankungen (Enzephalogramme) um in solchem Bereiche auftretende, durch kleinste Stoff- und Elektrizitätstransporte bewirkte Spannungsänderungen an intra-nicht-permutierenden Membranen handelt.

Im weiteren ist es ersichtlich, dass die Eigenschaft einer Membran, beispielsweise für Kationen durchlässig, aber für

* *Anmerkung bei der Korrektur.* Inzwischen in Gemeinschaft mit P. Moser angestellte weitere Versuche haben gezeigt, dass auch bei den 0,25% PAS enthaltenden Folien das Auftreten des Effektes sowie die Anisotropie der Leitfähigkeit und die absolute Grösse des Widerstandes Schwankungen untersorfen sind und dass daher diese Messgrössen von den speziellen Bedingungen der Herstellung in empfindlicher Weise abhängen.

Kationen intra-nicht-permutierend zu sein, zwar stets die Möglichkeit zweier gänzlich voneinander verschiedener stofflicher Vorgänge (verbunden mit Stromdurchgang von links nach rechts bzw. von rechts nach links in Abb. 1), aber *nicht unbedingt* das Auftreten eines entsprechenden dualen Potentials gewährleistet. Man sieht das sofort ein, wenn man sich vorstellt, dass als Lösungen I und II in Abbildung 1 anstatt NaCl und KCl zum Beispiel 2 gleichkonzentrierte in der Isotopenzusammensetzung verschiedene KCl-Lösungen gewählt werden. Für das Auftreten eines dualen Potentials muss in Wirklichkeit neben der Eigenschaft der Membran, intra-nicht-permutierend zu sein, die Eigenschaft der Membran verwirklicht sein, zwischen den verschiedenen Ionen, für welche die Membran intra-nicht-permutierend durchlässig ist, zu unterscheiden. Diese zusätzliche Forderung mag ein weiterer Grund dafür sein, dass bei der Feststellung dualer Potentiale an künstlichen Membranen zunächst nur kleine Absolutwerte des dualen Potentials beobachtet wurden. Trotzdem, oder gerade deswegen, dürfte ihre Feststellung interessante Ausblicke eröffnen.

Summary

It has been shown experimentally that two different potentials appear across an intra-nonpermutating membrane[3] when two different solutions (e.g., solution I: 0·1 *n* NaCl + 0·0001 *n* KCl; and, solution II: 0·1 *n* KCl + 0·0001 *n* NaCl) are separated by such a membrane, and when the pores of the intra-nonpermutating membrane are supplied with ions from either solution I or solution II (in this case: essentially with Na^+ ions from solution I, or essentially with K^+ ions from solution II). The theoretical background, and other considerations, for these experiments will be found in reference[2].

[3] An intra-nonpermutating membrane refers to a membrane whose pores are of such a size that the ions can move only in single file, and cannot change places with each other, during their passage through the membrane.

STUDIORUM PROGRESSUS

Gallen und Gallensäuren
Papierchromatographische Untersuchungen

Von G. L. Szendey[1]

Der Zusammenhang zwischen Leberfunktion, besonders der Gallenbildung bzw. -ausscheidung, und Psyche war schon im Altertum bekannt. Untersuchungen medizinischer und biochemischer Art zur Erforschung dieser wichtigen Organfunktion sind seit langem im Gange. Eine entscheidende Rolle wird den Gallensäuren als Hauptbestandteilen der Galle zugeschrieben.

Die Gesamtzusammensetzung der menschlichen Galle, die als erster Hammarsten[2,3] beschrieben hat, wird im wesentlichen auch heute noch anerkannt. Isaksson[4] hat die freien Gallensäuren der Menschengalle bestimmt und gibt folgende prozentualen Mittelwerte an: Cholsäure 20,1%, Chenodesoxycholsäure 20,0% und Desoxycholsäure 7,7% (berechnet auf die gesamten festen Bestandteile). Nach Wiggins[5] enthält die menschliche Galle Chenodesoxycholsäure als Hauptkomponente, weiterhin Cholsäure, Desoxycholsäure und Spuren von Lithocholsäure. Dieselbe Zusammensetzung wurde auch in Affengalle festgestellt. Beim Menschen beträgt das Taurin/Glycin-Verhältnis 1:1,4 bis 10, beim Affen 1:0,8 bis 11,5. Der Autor hat die konjugierten Gallensäuren im Gegenstrom verteilt, dann hydrolysiert und chromatographiert. Die Identifizierung erfolgte nach Wootton[6] durch IR-Spektrum. Eine vergleichende Untersuchung über Gallensäuren der Neugeborenen und Erwachsenen veröffentlichten Encrantz und Sjövall[7]. Nach ihren Beobachtungen nimmt das Mengenverhältnis der mit Glycin gepaarten Säuren im Vergleich zu den mit Taurin gepaarten Säuren mit dem Alter zu (G/T: 0,45 bis 3,1). Die Gallensäuren stehen in folgender Relation: Cholsäure–Chenodesoxycholsäure–Desoxycholsäure 1,2:1,0:0,6.

Ausser dem Menschen besitzen Wirbeltiere, sämtliche Amphibien, Fische und Reptilien die Fähigkeit, Gallensäuren zu bilden und geeignet abzuwandeln. Über vergleichende Untersuchungen der Gallensäurekomponenten von verschiedenen animalischen Gallen siehe [8–10].

Die Gallensäurebestimmungen im Blut zeigen je nach Methodik grosse Schwankungen. Minibeck[11] findet auf Grund des Gallensäuregehaltes keinen Unterschied zwischen Vollblut und Serum. Bei hepatogenem Ikterus steigt der Gallensäureblutspiegel.

Diese Beobachtung wird auch bei der Therapie von Asthma bronchiale und cardiale ausgenutzt, da durch klinische Beobachtungen bekannt wurde, dass Asthmatiker und Angina-pectoris-Patienten bei ikterischen Erkrankungen anfallsfrei bleiben. Im Harn kommen Gallensäuren nur bei hepatogenem Ikterus vor[12]. Zusammenfassende Angaben, Bestimmungsmethoden der Gallensäure im Blut, Harn usw. siehe [13–15].

Die Gallensekretionsstörungen können durch eine Substitution der fehlenden Galle günstig beeinflusst werden. Die Substitutionstherapie lässt sich am besten mit Humangalle durchführen, da diese nicht nur einen Funktionsersatz darstellt, sondern darüber hinaus die Sekretion von Lebergalle durch eine resorptive Wirkung anregt. Humangalle steht für die Therapie praktisch nicht zur Verfügung, daher werden möglichst gleichwertige tierische Gallen angewendet. Die Ochsengalle zeigt gute therapeutische Eigenschaften [16–18]. In Arzneimittelzubereitungen findet neben Ochsengalle auch Schweinegalle Verwendung.

Um festzustellen, welche der oben erwähnten tierischen Gallen auf Grund ihrer Gallensäurezusammensetzung für eine Substitution der Humangalle am besten geeignet ist,

[1] Forschungslaboratorien der Dr. Schwarz Arzneimittelfabrik GmbH., Monheim bei Düsseldorf.

[2] O. Hammarsten, Erg. Physiol. *4*, 1 (1905).

[3] O. Hammarsten, *Lehrbuch der physiologischen Chemie* (1922), p. 349.

[4] B. Isaksson, Acta Soc. med. Upsaliensis *59*, 307 (1953/54).

[5] H. S. Wiggins, Biochem. J. *56*, XXXIX (1954).

[6] I. D. P. Wootton, Biochem. J. *53*, 85 (1953).

[7] J.-C. Encrantz und J. Sjövall, Acta chem. Scand. *34*, 1005 (1956).

[8] H. Sobotka, *Physiological Chemistry of the Bile* (Baltimore, London 1937).

[9] H. Lettré und H. H. Inhoffen, *Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe* (Stuttgart 1936). Erweiterte Neuausgabe: H. Lettré, H. H. Inhoffen und R. Tschesche (Stuttgart 1954).

[10] G. A. D. Haslewood und V. Wootton, Biochem. J. *47*, 584 (1950).

[11] H. Minibeck, Biochem. Z. *297*, 29 (1938).

[12] H. Minibeck, Biochem. Z. *297*, 40 (1938).

[13] Documenta Geigy, 1955, p. 307.

[14] B. Flaschenträger, *Physiologische Chemie* (Berlin–Göttingen–Heidelberg 1956).

[15] K. Hinsberg und K. Lang, *Medizinische Chemie* (München–Berlin–Wien 1957).

[16] G. Pause, Fortschr. Med. *69*, 210 (1951).

[17] G. Zeise, Med. Klin. *47*, 1696 (1952).

[18] H. Gross, Therap. Gegenw. *95*, 423 (1956).

Tabelle I – R_f-Werte der Gallensäuren

Gallensäuren		R_f	Farbe im UV-Licht nach Behandlung mit $SbCl_3$
Glykocholsäure		0,00–0,05	violettrot
Taurocholsäure		0,00–0,05	violettrot
Cholsäure	3α·7α·12α-Trioxycholansäure	0,16	violettrot
Hyocholsäure*	3α·6α·11α-Trioxycholansäure***	0,18	violettorange
Hyodesoxycholsäure	3α· 6α-Dioxycholansäure	0,25	violettorange
Chenodesoxycholsäure* (Anthropodesoxycholsäure)	3α· 7α-Dioxycholansäure	0,39	violett
Desoxycholsäure	3α·12α-Dioxycholansäure	0,41	violett
Dehydrocholsäure	3 ·7 ·12- Triketocholansäure	0,60	türkisblau
Dehydrodesoxycholsäure**	3·12- Diketocholansäure	0,75	türkisblau
Lithocholsäure	3α-Oxycholansäure	0,78	blau
Cholansäure		0,98	gelb

* Herrn Prof. G. A. D. Haslewood (Biochemistry and Chemistry Department, Guy's Hospital Medical School, London) danke ich für die freundliche Überlassung der aus Schweinegalle isolierten Chenodesoxycholsäure und Hyocholsäure;

** ferner Herrn Dr. O. Cerri (Istituto Sieroterapico Milanese «Serafino Belfanti», Milano) für die Dehydrodesoxycholsäure-Standardsubstanz.

*** G. A. D. Haslewood, Biochem. J. *56*, XXXVIII (1954).

wurden – im Rahmen einer neu entwickelten Methode – vergleichende Untersuchungen durchgeführt.

Jacobs[19] beschreibt eine Methode über den Nachweis von Schweinegalle in Mischungen mit Rinder- oder Schafgalle. Die Schweinegalle – oder besser gesagt – ihre Hauptkomponente, die Glycohyodesoxycholsäure, kann aus ihren Lösungen durch NaCl ausgesalzt werden. Diese Methode eignet sich aber nicht für exakte Untersuchungen.

Zur Trennung und Identifizierung von Gallensäuren-Gemischen, weiterhin zur Untersuchung und Charakterisierung von hydrolysierten Gallensäften hat sich die papierchromatographische Methode am besten bewährt.

Sjövall trennt die freien Gallensäuren mit Hilfe der Lösungsmittelsysteme Isopropyläther-Heptan[20,21] und Amylacetat-Heptan[22]. Als stationäre Phase dient 70%ige Essigsäure. Die konjugierten Gallensäuren lassen sich in Isopropyläther-Heptan, in Äthylenchlorid-Heptan oder auch in Äthylenchlorid-Butanol im Gleichgewicht mit 70%iger Essigsäure trennen[22]. Zur Untersuchung der freien Gallensäuren arbeiten Kritschevsky und Kirk[23,24] mit einem Lösungsmittelgemisch Propanol-Äthanolamin-Wasser 90:5:5. Beyreder und Rettenbacher[25] benutzen Toluol-Eisessig-Wasser 40:40:8. Siperstein *et al.* verwenden basische Lösungsmittelgemische[26]. Haslewood[27] beschreibt eine Methode unter Verwendung des Lösungsmittelsystems von Bush[28]. Haslewood und Sjövall[29] trennen die konjugierten Gallensäuren mit Isopropyläther-Heptan 75:25, 85:15 bzw. 60:40 im Gleichgewicht mit 70%iger Essigsäure. Dieselben Autoren verwenden auch Butanol, mit 3%iger Essigsäure gesättigt. Kuroda[30] benutzt Methanol-Wasser 2:3. Kritschevsky und McCandless[31] empfehlen *n*-Propanol-Ammoniak-Wasser 90:2:8 und *n*-Propanol-Ammoniak-Äthanolamin-Wasser 89:2:1:8 für die Trennung von Gallensäuren. Cerri und Spialtini[32] verwenden *n*-Butanol, mit Wasser gesättigt, unter Zugabe von einigen Tropfen konz. Ammoniak.

Es wurde allgemein beobachtet, dass die Gallensäuren sowie ihre Salze gleiche R_f-Werte zeigen.

Zur Sichtbarmachung der Flecken werden Phosphormolybdänsäure[20,23,27,29,30], gesättigte alkoholische Jodlösung[20,25], Rhodamin B[20], *m*-Dinitrobenzol[30] (Dragendorff-Reagens[30]), Phosphorsäure[20,24,25], Vanillin-Phosphorsäure-Butanol-Reagens[32] und Antimontrichlorid in Eisessig[26,33,34] angewandt.

Die papierchromatographisch getrennten Gallensäuren können nach Eriksson und Sjövall[35,36] auch quantitativ bestimmt werden.

Die Flecken werden dem Leitchromatogramm entsprechend ausgeschnitten und mit Alkohol eluiert. Danach wird die Lösung eingedampft, in 65%iger Schwefelsäure gelöst und erwärmt. Nach der Farbentwicklung werden die Extinktionswerte – freie und konjugierte Cholsäure bei 320 mμ, Chenodesoxylcholsäure und Hyodesoxycholsäure bei 380 mμ, konjugierte Chenodesoxycholsäure bei 305 mμ, Desoxycholsäure frei bei 385 mμ und konjugiert bei 389 mμ – gemessen. Die Farbreaktion mit 65%iger Schwefelsäure[37] kann für die gleichzeitige Einzelbestimmung von Cholsäure und Desoxycholsäure bei 318 und 350 mμ ausgenutzt werden[38,39]. Die Chabrol-Reaktion[40,41] – Vanillin-Phosphorsäure-Reagens – ist

[19] Ph. Jacobs, Pharm. Weekblad *92*, 239 (1957).
[20] J. Sjövall, Acta chem. Scand. *6*, 1552 (1952).
[21] J. Sjövall, Acta chem. Scand. *8*, 339 (1954).
[22] J. Sjövall, Ark. Kemi *8*, 299 (1955).
[23] D. Kritschevsky und M. R. Kirk, Arch. Biochem. Biophysics *35*, 346 (1952).
[24] D. Kritschevsky und M. R. Kirk, J. Amer. chem. Soc. *74*, 4713 (1952).
[25] J. Beyreder und H. Rettenbacher-Däubner, Mh. Chem. *84*, 99 (1953).
[26] M. D. Siperstein, F. M. Harold, I. L. Chaikoff und W. G. Dauben, J. biol. Chemistry *210*, 181 (1954).
[27] G. A. D. Haslewood, Biochem. J. *56*, 581 (1954).
[28] I. E. Bush, Biochem. J. *50*, 370 (1952).
[29] G. A. D. Haslewood und J. Sjövall, Biochem. J. *57*, 126 (1954).
[30] M. Kuroda, J. Jap. biochem. Soc. *27*, 301 (1955).
[31] D. Kritschevsky und R. F. J. McCandless, J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit. *45*, 385 (1956).
[32] O. Cerri und A. Spialtini, Boll. chim. pharmac. *96*, 193 (1957).
[33] J. B. Carey Jr. und H. S. Bloch, J. lab. clin. Med. *44*, 486 (1954).
[34] J. B. Carey Jr., Science *123*, 892 (1956).
[35] S. Eriksson und J. Sjövall, Acta chem. Scand. *8*, 1099 (1954).
[36] J. Sjövall, Ark. Kemi *8*, 317 (1955).
[37] F. Bandow, Biochem. Z. *301*, 37 (1939).
[38] L. C. Kier, J. lab. clin. Med *40*, 755 (1952).
[39] L. C. Kier, J. lab. clin. Med. *40*, 762 (1952).
[40] E. Chabrol, R. Charonnat, J. Cottet und P. Blonde, C. R. Soc. Biol. Filiales *115*, 834 (1934).
[41] Y. Abe, J. Biochem. (Tokyo) *25*, 181 (1937).

für die Bestimmung von Desoxycholsäure bei 465 und 545 mμ auch in Anwesenheit von anderen Gallensäuren gut brauchbar[42]. Desoxycholsäure wird neben Cholsäure in alkoholischer 0,1 *n*-Natronlauge bei 280 mμ bestimmt[43].

Eigene Versuche führten zu einer leicht und schnell durchführbaren papierchromatographischen Methode. Eine gute Auftrennung wurde mit Hilfe des Lösungsmittelsystems Xylol-Methyläthylketon auf dem mit Propylenglykol imprägnierten Schleicher & Schüll 2043b Mgl-Papier erzielt. Zur Sichtbarmachung der Flecken wurde 20%ige Antimontrichloridlösung in Chloroform benutzt.

Untersucht wurden reine Gallensäuren als Standardsubstanzen, Gemische derselben und alkalisch hydrolysierte Menschen-, Ochsen- und Schweinegallen.

Reine Gallensäuren (Tabelle I)

Die Wanderungsgeschwindigkeiten steigen in nachstehender Reihenfolge: Trioxy-, Dioxy-, Triketo-, Diketo-, Oxyketo- und Oxycholansäure.

D *H*

Die R_f-Werte sind gut reproduzierbar, aber abhängig von der Art der Imprägnierung, vom Alter der Imprägnierungslösung, des Fliessmittels und von der Temperatur.

Es wird bei Identitätsprüfungen empfohlen, Vergleichssubstanzen mitzuchromatographieren.

Die Alkalisalze zeigen die gleichen R_f-Werte wie die freien Säuren.

Versuche zur quantitativen Auswertung der Chromatogramme sind im Gange.

Abb. 1. Aufnahme im UV-Licht

D Desoxycholsäure mit Spuren von Cholsäure.

H Hyocholsäure mit Spuren von Hyodesoxycholsäure. Unter der Hyocholsäure sind Spuren von nicht hydrolysierten konjugierten Gallensäuren sichtbar.

Hydrolysierte Gallen (Tabelle II)

a) *Gallensäuren.* Aus den alkalischen Gallenhydrolysaten wurden die freien Gallensäuren mittels verdünnter Schwefelsäure gefällt und mit der beschriebenen Methode untersucht.

Menschen- und Ochsengalle zeigen das gleiche papierchromatographische Bild. Schweinegalle enthält Gallensäuren, die in Menschen- und Ochsengalle nicht vorkommen (Hyocholsäure in kleinen Mengen und Hyodesoxycholsäure); des weiteren fehlt ihr die für Menschen- und Ochsengalle charakteristische Cholsäure. Die Schweinegalle wird durch Hyodesoxycholsäure charakterisiert (vgl. Tabelle I und II, Abb. 2 und 3).

Menschengalle enthält relativ die meiste Chenodesoxycholsäure. Lithocholsäure, die am stärksten in Gallen- und Darmsteinen vertreten ist[44], wurde nur in Spuren nachgewiesen.

[42] E. L. Pratt und H. B. Corbitt, Analyt. Chem. *24*, 1665 (1952).

[43] G. Biglino und M. Gennaro-Soffietti, Ann. Chim. (Roma) *41*, 603 (1951).

[44] F. S. Fowweather, Biochem. J. *44*, 607 (1949).

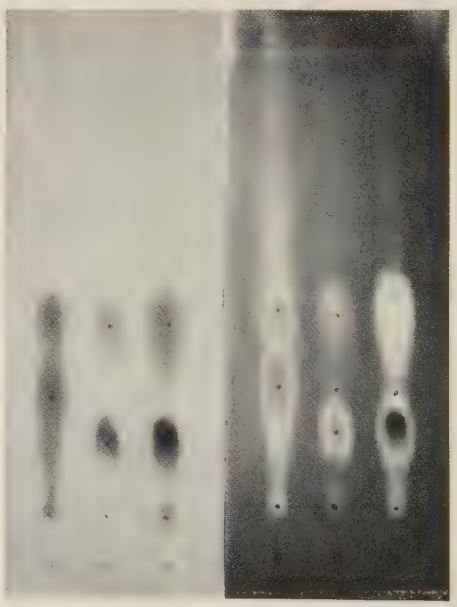
Tabelle II

In Menschen-, Ochsen- und Schweinegalle gefundene Gallensäuren

Menschengalle* und Ochsengalle	Schweinegalle
Cholsäure	Hyocholsäure (in kleinen Mengen)
Eine nicht identifizierte Komponente (grüne Fluoreszenz, R_f: 0,20)	Hyodesoxycholsäure
Chenodesoxycholsäure bzw. Desoxycholsäure	Desoxycholsäure bzw. Chenodesoxycholsäure
Lithocholsäure (nur in Spuren) .	

* Ich möchte Herrn Prof. H. Gillmann (I. Medizinische Klinik der Medizinischen Akademie Düsseldorf) auch an dieser Stelle für die Überlassung von Menschengalle vielmals danken.

b) *Aminosäuren.* Nach Entfernen der mit Schwefelsäure gefällten Gallensäuren wurde das Hydrolysat mit Hilfe des Lösungsmittelsystems *n*-Butanol-Eisessig-Wasser 40:8:20 und des Papiers Schleicher & Schüll 2043b Mgl (Sprühreagens: 0,2%ige Ninhydrinlösung in Chloroform-Butanol 1:1) auf Aminosäuren untersucht. Menschen-, Ochsen- und Schweinegalle zeigten das gleiche papierchromatographische Bild. Die einzelnen Aminosäuren wurden nicht identifiziert.



S *M* *O* *S* *M* *O*

Abb. 2. Aufnahme im Tages- und UV-Licht. Aufsteigende Methode

S Schweinegalle;
M Menschengalle;
O Ochsengalle.

Knedel und Neikes[45] untersuchten die freien Aminosäuren und Amine in der menschlichen Galle. Die Autoren haben eine relativ konstante Aminosäurezusammensetzung des Gallensaftes nachgewiesen, die auch bei pathologischen Veränderungen der Gallenblase keine sicheren Abweichungen erkennen lässt.

Die verschiedenen Gallen können nicht durch die Aminosäurezusammensetzung charakterisiert werden.

[45] M. Knedel und K. Neikes, Klin. Wschr. *34*, 1005 (1956).

Auf Grund der Untersuchungen kann festgestellt werden, dass im Gegensatz zur Schweinegalle Menschen- und Ochsengalle in bezug auf die Gallensäurezusammensetzung als physiologisch verwandte biologische Stoffe zu betrachten sind.

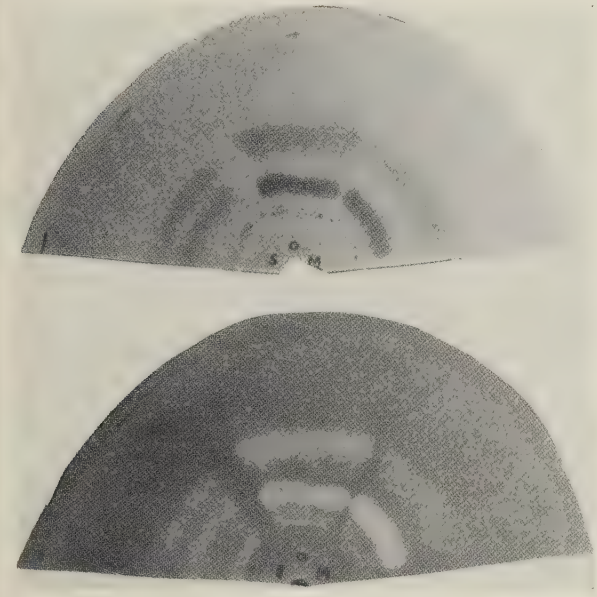


Abb. 3. Aufnahme im Tages- und UV-Licht. Rundfiltertechnik
S Schweinegalle;
O Ochsengalle;
M Menschengalle.

Beschreibung der Versuche

Trennung und Identifizierung der Gallensäuren:

Papier: Lufttrockene Schleicher & Schüll 2043b Mgl-Papierstreifen der Grösse 8 × 30 cm oder Rundfilter.

Das Papier wird genau 8 min mit 20%iger 1,2-Propylenglykol-Lösung in Chloroform imprägniert, dann zwischen Filterpapierbogen abgepresst und 1–2 min an der Luft trocknen gelassen.

Die Gallensäuren und Gallenhydrolysate werden aus 1–2%iger Methanol-Chloroform(1:1)-Lösung aufgetragen und die Chromatogramme nach der aufsteigenden Methode bzw. Rundfiltertechnik mit dem Lösungsmittelsystem Xylol-Methyläthylketon 1:1 entwickelt.

Entwicklungszeit: 2–3 h. Versuchstemperatur: 22°C ± 2°.

Das Imprägnierungsmittel lässt sich etwa eine Woche lang gut verwenden. Es ist zweckmässig, das Lösungsmittelsystem nach 2–3 Entwicklungen frisch vorzubereiten.

Nach Beendigung der Entwicklung werden die Chromatogramme im Trockenschrank mit Umluft $^1/_2$ h bei 100 bis 110°C vollständig von Lösungsmittel und Propylenglykolimprägnierung befreit.

Zur Sichtbarmachung der Flecken dient 20%ige Antimontrichloridlösung in Chloroform, durch welche die getrockneten Chromatogramme gezogen werden. Nach anschliessender Erwärmung, 5–10 min auf 100–110°C, erscheinen die Flecken mit rotvioletter Farbe. Die Auswertung wird im filtrierten UV-Licht vorgenommen (vgl. Tabelle I).

Empfindlichkeit der Methode: 5–10 µg.

Für die Sichtbarmachung kann auch 30%ige wässerige Phosphorsäurelösung als Sprühreagens benutzt werden. Nach Trocknen auf 110–120°C erscheinen die Flecken im UV-Licht mit blauvioletter Fluoreszenz.

Hydrolyse der Gallensäfte:

50–100 ml der zu hydrolysierenden Galle werden mit der entsprechenden Menge Natronlauge auf etwa 10% an Natriumhydroxyd eingestellt und am Rückflusskühler 18–24 h gekocht. Zur Beseitigung der Schaumneigung bewährte sich ein Zusatz von 0,1% Bayer-Entschäumer E 100 in alkoholischer Lösung.

Nach Beendigung der Hydrolyse wird das alkalische Reaktionsgemisch mit 20%iger Schwefelsäure zur Fällung der freien Gallensäuren angesäuert (pH – 3–4).

Die ausgefallene braune amorphe Substanz wird mit Wasser stark ausgewaschen und im Trockenschrank getrocknet. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Methanol-Chloroform (1:1) lässt sich das Gemisch der freien Gallensäuren in schöner kristalliner Form erhalten.

Summary

In cases of bile-secretion disturbances substitution-therapy can be performed using suitable animal biles equivalent to human bile. Comparative investigations have been made to establish which animal bile is in practice the most suitable for bile substitutiontherapy based on its bile acid components.

A new paper partition chromatographic method has been applied for separation and identification of free bile acids. Ascending development was used on Schleicher & Schüll 2043b Mgl paper impregnated with 20 v/v% propylene glycol in chloroform. The xylene-methylethylketone 1:1 solvent system gave good separation. The bile acids can be detected by immersing the chromatograms in 20 w/v% $SbCl_3$ in chloroform followed by drying and heating for 5–10 min at 100–110°C. The spots show intense reddish-violet or blue fluorescence in filtered UV-light (see Table I).

These investigations have shown that human and ox biles are, in contrast to pig bile, physiologically related biological substances regarding their bile acid components.

STUDIORUM PROGRESSUS

Identification of Human Serum Proteins Binding Iron, Copper, and Thyroid Hormones by Starch Gel Electrophoresis

By A. C. Allison*

It has been recognized for many years that metal ions and thyroid hormones in the blood stream are bound to plasma proteins. The high resolution achieved by the starch gel electrophoresis technique of Smithies[1], and the use of the discontinuous buffer system of Poulik[2], has permitted the accurate identification of the serum proteins responsible for the binding and has given some new information about their genetical control and properties. A typical starch gel pattern of human serum proteins

* National Institute for Medical Research, London.

[1] O. Smithies, Biochem. J. *61*, 629 (1955).

[2] M. D. Poulik, Nature *180*, 1477 (1957).

is shown in Figure 1. It is widely believed that the high resolving power of the starch gel system lies in a molecular sieving effect of the supporting medium, which allows greater mobility of small molecules than large molecules[3]. Hence proteins are separated on the basis of differences in size as well as charge. Consistent with this interpretation is the low mobility in starch gels of high-molecular weight components such as β-lipoprotein[3,4], 19 S α_2 glycoprotein[3], macroglobulin[5], and thyroglobulin (see below).

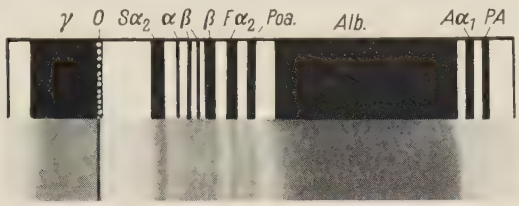


Fig. 1. – Starch gel electrophoresis of serum proteins in borate buffer, showing the main components, from left to right: γ globulin; origin; slow α_2 globulin; $\alpha\beta$ components (haptoglobins); β (transferrin C); fast α_2 (including caeruloplasmin); post-albumin; albumin; acidic α_1-glycoprotein[5a]; prealbumin.

Iron. – It has been established that iron is carried in plasma in the form of a ferric complex with a β-globulin of molecular weight about 88,000 which has been called 'transferrin' or 'siderophilin'[6]. Two-dimensional electrophoresis shows that the β-globulins are resolved into two main components in starch gels[3]. One component has a low mobility in the gel, and is easily identified as β-lipoprotein[3,4]. The other is a β-globulin band which in some sera shows splitting into two approximately equal components[7]. The splitting occurs only in certain families and

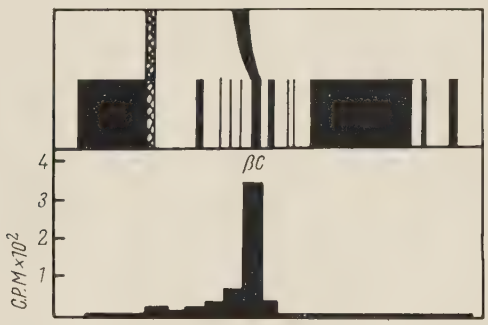


Fig. 2. – Above, migration of purified transferrin and normal serum on starch gel electrophoresis. The transferrin band is continuous with the βC component. Below, radioactivity in different serum fractions after ^{59}Fe labelling. The peak of activity corresponds with the βC component.

[3] M. D. Poulik and O. Smithies, Biochem. J. *68*, 636 (1958).

[4] H. J. Silberman, Biochim. biophys. Acta *24*, 641 (1957). – J. M. Fine and M. Burstein, Exper. *14*, 411 (1958).

[5] R. L. Engle, jr., K. R. Woods, and J. H. Pert, J. clin. Invest. *36*, 888 (1957).

[5a] K. Schmid, J. Amer. chem. Soc. *72*, 2816 (1950). – H. E. Weimer, J. W. Mehl, and R. J. Winzler, J. biol. Chem. *185*, 561 (1950).

[6] C. B. Laurell, and B. Ingelman, Acta chem. scand. *1*, 770 (1947). – J. L. Oncley, G. Scatchard, and A. Brown, J. Phys. coll. Chem. *51*, 184 (1947). – H. E. Schade, R. W. Reinhart, and H. Levy, Arch. Biochem. *2*, 170 (1949). – E. J. Cohn, Ann. int. Med. *26*, 341 (1947). – H. E. Schultze, K. Heide, and H. Muller, Behringwerk-Mitt. No. 32, 24 (1957).

[7] O. Smithies, Nature *180*, 1482 (1957). – W. R. Horsfall and O. Smithies, Science *128*, 35 (1958). – O. Smithies, Nature *181*, 1203 (1958). – H. Harris, E. B. Robson, and M. Siniscalco, Nature *182*, 452 (1958).

appears to be under the control of a single pair of genes. The majority of human subjects in all populations so far tested show only a single β band, a phenotype which has been termed βC. Other phenotypes described include $\beta\,B_1\,C$, $\beta\,B_2\,C$, $\beta\,C\,D_2$ and $\beta\,C\,D_1$. The B components have a higher and the D components a lower anodal mobility than C at pH 8·4.

The investigations which will be described establish that the β-globulin which shows genetically controlled variation is, in fact, transferrin. In the first experiment a purified preparation of transferrin was submitted to starch gel electrophoresis together with a normal human serum. The transferrin band was clearly continuous with the βC component (Fig. 2). In the second experiment the position of radioactive iron carried by serum proteins was determined. Serum was obtained from 3 human subjects 24 h after oral administration of 10 μC high specific activity ^{59}Fe. The sera were submitted to starch gel electrophoresis using the starch grain method of insertion and both the borate and *tris*-borate buffer systems. After staining the gel was cut into equal sections in such a way as to have the main protein components in separate sections, and the radioactivity in each section was assayed in a well-type scintillation counter. A correction for volume was made by counting sections of a gel containing a standard iron solution. A typical result is shown in Figure 2. The peak of activity clearly coincides with the β band; the slight activity between this band and the origin could be due to some trailing of this component on the upper and lower surfaces of the gel. Similar results were obtained when serum was incubated with 0·4 μg $^{59}Fe^{3+}$ per ml and dialysed against buffer before electrophoresis. The latent iron-binding capacity in the two sera used was 0·5 and 0·6 μg per ml. Two African sera showing double β-globulin bands, corresponding to the phenotypes $\beta\,C\,D_1$ and $\beta\,C\,D_2$, were incubated with $^{59}Fe^{3+}$ in concentrations of 0·4 μg per ml, this again being less than the latent iron-binding capacity of the sera. After dialysis the sera were submitted to prolonged electrophoresis in the discontinuous buffer system, which ensures good separation of the β-globulin components, in confirmation of the report of Harris *et al.*[7]. The result is shown in Figure 3B; most of the radioactivity was distributed between the two β peaks.

Fig. 3. – Radioactivity after starch gel electrophoresis in *tris*-borate buffer of a T_f^C/T_f^{D2} serum incubated with ^{59}Fe. The radioactivity is nearly equally distributed between the βC and βD_2 peaks.

Further observations were made by immunoelectrophoresis, which has already been adapted to the starch gel system[3,8]. After preliminary electrophoresis in *tris*-borate buffer[2], a thin slice of starch gel was stained to show the β components. A narrow longitudinal section of the remainder of the gel was placed in a large Petri dish

[8] M. D. Poulik, Nature *177*, 982 (1956).

and just covered with molten 1·5% agar at 40°C. When the agar had set, a trough was cut parallel to the starch gel and filled with a rabbit antiserum to human transferrin. In β-C sera a single precipitation line in the position of the β component was observed, but in βCD_1 and βCD_2 sera two lines, continuous at one point, were apparent (Fig. 4). These experiments show that both βC and βD components react with anti-transferrin serum.

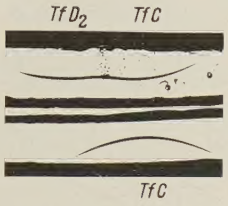


Fig. 4.—Micro-immunoelectrophoresis, using *tris*-borate buffer, of sera from $T_f{}^C/T_f{}^{D_2}$ (above) and $T_f{}^C/T_f{}^C$ below.

SMITHIES[9] has independently concluded that the β-globulins subject to genetical variation are transferrins. He has made the appropriate suggestion that they should be known as transferrin or *Tf* types C, B_1C, B_2C, CD_1, and CD_2, the corresponding genes being Tf^C, Tf^{B_1}, and so forth. Incidentally, the finding of HORSFALL and SMITHIES[7] that the normal β-band is lacking in starch gel patterns of a Tf^B/Tf^B subject suggests that the β-band consists largely of transferrin. The observations presented in this paper indicate that the β variants can carry iron and react with anti-transferrin serum. They may differ from the normal transferrin molecule only in small details of structure and charge, in the same way that the abnormal hemoglobin types S and C appear to differ from the normal adult type only in single amino-acid substitutions in each half-molecule[10].

Drs. D. R. BANGHAM and D. E. H. TEE kindly allow me to quote their finding that a very similar β-globulin variation occurs among monkeys (*Macaca mulatta*), some animals having a single and others a double component. Whether any of the complicated genetically-controlled β-globulin variations in other species[11] concern transferrins is at present unknown.

Copper.—The copper binding protein, caeruloplasmin, has aroused interest recently because it is much reduced in amount in, or altogether absent from, the sera of subjects with WILSONS disease[12]. Failure of synthesis of this protein may indeed be the primary defect in subjects homozygous for the abnormal gene. Heterozygous carriers of the gene frequently have subnormal caeruloplasmin levels. Caeruloplasmin has been characterized as an α_2-globulin of molecular weight about 150,000[13]. DE GROUCHY[14] using the *p*-phenylenediamine staining method of URIEL[15] states that after starch-gel electrophoresis the caeruloplasmin activity is found in the fast α_2 region. This has been confirmed by experiments in which purified caeruloplasmin has been run alongside serum in a starch gel. The caeruloplasmin band was clearly continuous with the fast α_2 component and both were stained by *p*-phenylenediamine.

Thyroxine and other iodine-containing compounds.—It is generally accepted that thyroxine is normally bound to a plasma protein having an electrophoretic mobility on filter paper at pH 8·6 between those of α_1- and α_2-globulins[16]. However, reports have appeared of a thyroxine-binding protein in the prealbumin region in sera of patients with nephrosis and in cerebrospinal fluid[17]. In a preliminary communication[18] it has been stated that after starch gel electrophoresis of serum proteins thyroxine was located mainly in the prealbumin region. Moreover, when a prealbumin-rich fraction was added to normal human serum[19], some of the thyroxine label was found in the prealbumin region, from which it was concluded that prealbumin and the α-component are two distinct thyroxine-binding proteins, albumin being a secondary binding protein effective only at higher concentrations of thyroxine. TATA[20] has presented evidence in support of an alternative hypothesis, that the thyroxine-binding property of the α-globulin fraction is due to prealbumin present in this region after paper electrophoresis in the form of a complex with another serum protein. Purified prealbumin migrates in the typical position ahead of albumin on filter paper electrophoresis at pH 8·6.

Fig. 5.—Pattern obtained by starch gel electrophoresis of purified caeruloplasmin and normal human serum. The caeruloplasmin band is continuous with the fast α_2 band.

During the course of the present study, the position of ^{131}I-radioactivity was determined after starch gel electrophoresis of sera to which labelled thyroxine and triiodothyronine had been added, and of subjects given tracer and therapeutic doses of radioiodide. The first experiments were carried out with serum from normal adult subjects to which, after preliminary dialysis against polyvinylpyrrolidine to remove as much thyroxine as possible, ^{131}I-L-thyroxine and ^{131}I-3, 5, 3′-triiodo-L-thyronine were added in concentrations of 0·1 to 0·6 μg per ml. After electrophoresis in borate buffer and staining of the gels they were cut into sections the radioactivity of which was assayed in a well-type scintillation counter. A typical result is shown in Figure 6. It is clear that when thyroxine or triiodothyronine in concentrations up to 0·2 μg per ml is added to serum, nearly all the radioactivity is concentrated in the faster-moving of the two prealbumin bands. When 0·4 μg per ml of these compounds was added, the radioactivity was about equally distributed between the first prealbumin band and albumin. These results suggest that prealbumin can bind about 0·2 μg thyroxine or triiodothyronine per ml serum, which is less than that reported by RICH and BEARN[18] but approximately the same as the α-thyroxine-binding-protein is reported to bind on filter paper electrophoresis in barbiturate buffer[16].

[9] O. SMITHIES, personal communication.

[10] V. M. INGRAM, Nature *180*, 326 (1957).—J. A. HUNT and V. M. INGRAM, Nature *181*, 1062 (1958).

[11] O. SMITHIES and C. G. HICKMAN, Genetics *43*, 374 (1958).—C. G. ASHTON, Nature *180*, 917 (1957); *181*, 849 (1958); *182*, 193 (1958); *182*, 1029 (1958).

[12] A. G. BEARN and H. G. KUNKEL, J. Lab. clin. Med. *45*, 623.—A. G. BEARN, Amer. J. Med. *22*, 747 (1957).

[13] C. G. HOLMBERG and C.-B. LAURELL, Acta chem. scand. *2*, 550 (1948).

[14] J. DE GROUCHY, Rev. franç. Etudes clin. biol. *3*, 621 (1958).

[15] J. URIEL, Bull. Soc. Chim. biol., Suppl. *1*, 105 (1957).

[16] J. ROBBINS and J. E. RALL, Rec. Adv. Hormone Res. *13*, 161 (1957).

[17] J. ROBBINS, J. E. RALL, and M. L. PETERMAN, J. clin. Invest. *36*, 1333 (1957).

[18] C. RICH and A. G. BEARN, Endocrinology *62*, 687 (1958).

[19] S. H. INGBAR, Endocrinology *63*, 256 (1958).

[20] J. TATA, Nature *183*, 877 (1959).

These results focus attention upon prealbumin as the main thyroxine-binding protein of human serum. Prealbumin has been purified and its properties studied by Schultze *et al.*[21]. We have run their preparation alongside normal human serum in starch gels and found it to be continuous with the first prealbumin band. This protein is quite different from the acidic α_1 glycoprotein which Rich and Bearn[18] suggest may be the thyroxine-binding protein, but which, in fact, appears to be continuous with the second prealbumin band and does not bind thyroxine. Prealbumin has a molecular weight of 61,000 and is characterized by a tryptophan content (2·5%) which is much higher than that of other serum proteins. Prealbumin has an intense tryptophan fine-structure absorption band in the ultraviolet at 2901 A and another fine-structure band at 2839 A[22]. A number of investigations[21] have established that there is a high content of prealbumin in cerebrospinal fluid, where, as already stated[16,17], it binds thyroxine.

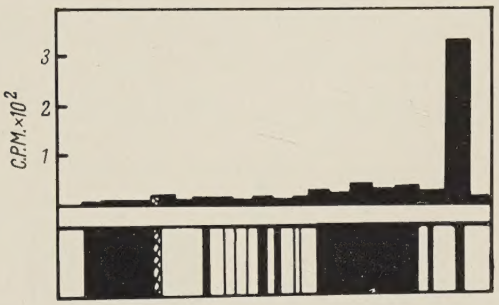


Fig. 6. – Radioactivity in various protein bands of normal human serum incubated with 0·2 µg. ^{131}I-thyroxine per ml and submitted to starch gel electrophoresis.

A thyroxine-binding protein with many of the properties of prealbumin has also been found in human and monkey amniotic liquor[23]. This protein reacts with antisera against prealbumin[20], moves ahead of albumin on starch gel electrophoresis and has a high tryptophan content. These observations suggest that prealbumin may cross the placenta, carrying maternal thyroxine. Little is known about the passage of thyroxine across the placenta of primates, but in rabbits significant proportions of labelled thyroxine injected into the mother appear in the fetal circulation only after about the 30th day of gestation[24]. At about the same time a thyroxine-binding protein appears in fetal plasma having the same electrophoretic mobility as the corresponding maternal protein; but whether it is of fetal or maternal origin has not been established.

Some observations have also been made on sera of patients with carcinoma of the thyroid gland treated with radioiodide. In the majority of cases, three well-defined peaks of activity were observed after atarch gel electrophoresis (Fig. 7). One peak corresponded to the first prealbumin band, and probably represents thyroxine bound to prealbumin. The second peak was in the albumin region and may represent thyroxine bound to albumin or, more probably, an iodinated protein with approximately the same electrophoretic mobility as albumin in starch gels.

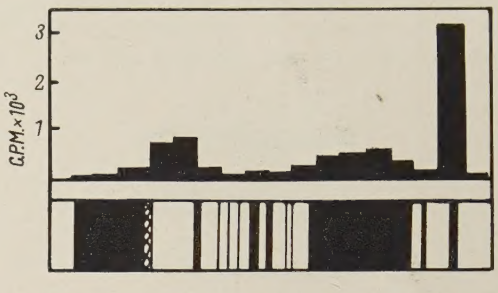


Fig. 7. – Radioactivity in serum proteins of a patient with carcinoma of the thyroid receiving radioiodide therapy, 72 h after administration of 7 mC dose.

Such a protein component has been described by several authors[25] and has been shown to be immunologically distinct from iodinated serum albumin[26]. The third peak of radioactivity near the origin had the same electrophoretic mobility on starch gels as purified human thyroglobulin. Labelling of thyroglobulin in sera of patients receiving radioiodine therapy has previously been demonstrated[27]. On filter paper electrophoresis thyroglobulin migrates in the α-globulin region, and the low mobility in starch gels is presumably due to the relatively large size of the molecules (ca. 660,000)[28].

Acknowledgments. – I am indebted to Dr. R. Oliver, Churchill Hospital, Oxford, for sera of patients receiving tracer and therapeutic doses of radioiodine, and Drs. B. Mallett and S. T. E. Callender, Radcliffe Infirmary, Oxford, for sera from patients receiving radioiron. Dr. P. H. G. Gell kindly supplied purified preparations of caeruloplasmin and an anti-transferrin serum, and Dr. B. A. Askonas purified human thyroglobulin. I am indebted also to Dr. J. Tata for providing labelled thyroxine and triiodothyronine and for helpful discussions, and to Dr. D. R. Bangham for allowing me to quote unpublished observations.

Résumé

On a analysé au moyen d'électrophorèse sur gel d'amidon les protéines qui, dans le sérum humain, lient le fer, le cuivre et l'hormone thyroïdienne, en utilisant comme témoins des protéines purifiées et la radioactivité. Le fer est lié par la β-globuline qui, dans certaines familles, paraît se diviser en deux composants. Le cuivre est lié par la céruloplasmine, qui émigre dans la position α_2 rapide. La protéine principale liant la thyroxine est la préalbumine.

[21] H. E. Schultze, M. Schonberger, and G. Schwick, Biochem. Z. *328*, 267 (1956).

[22] W. G. Gratzer, personal communication.

[23] Unpublished observations by D. R. Bangham, J. Tata, and A. C. Allison.

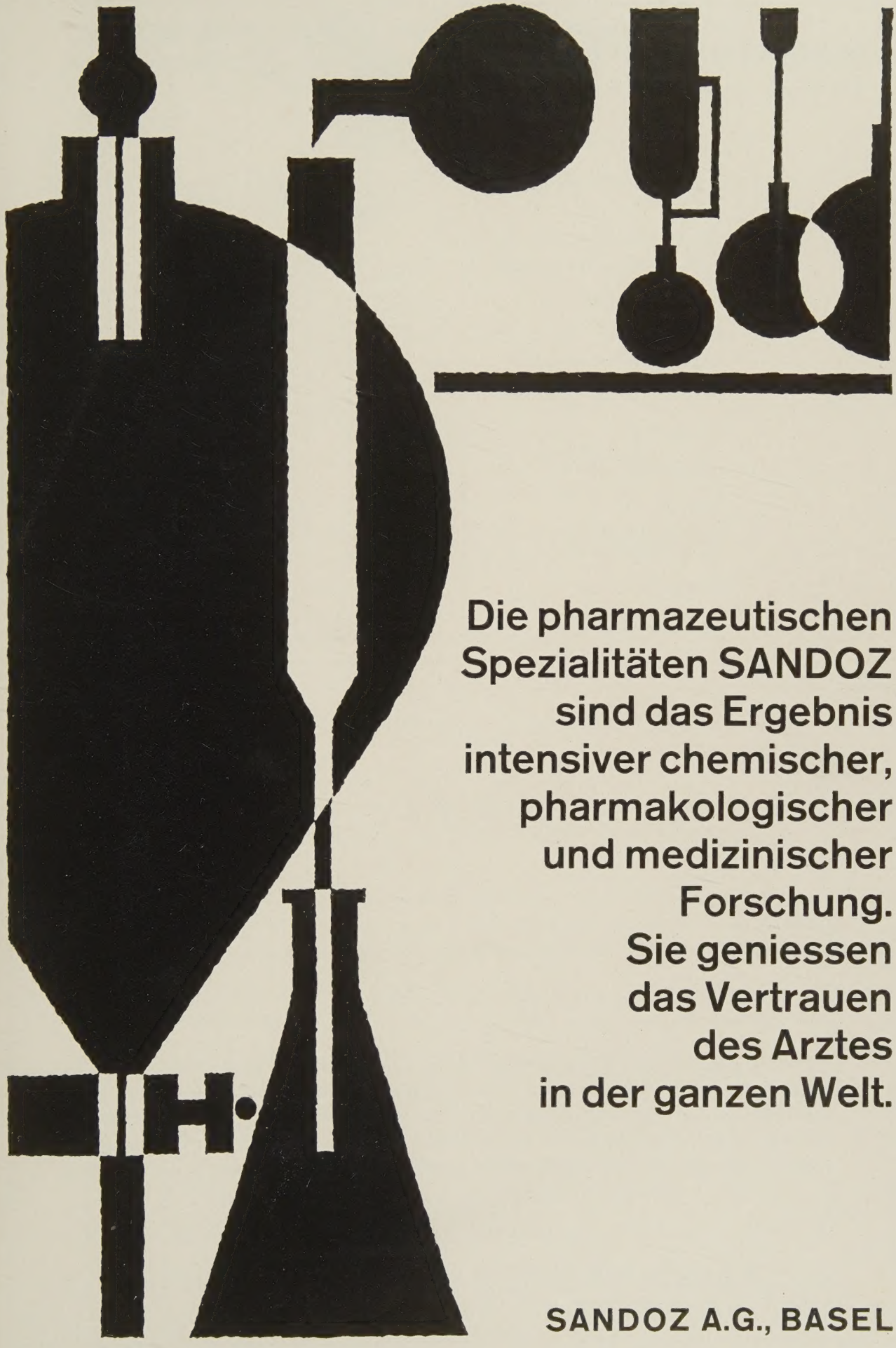
[24] C. Osorio and N. B. Myant, Nature *182*, 866 (1958).

[25] W. P. Deiss, E. C. Albright, and F. C. Larson, J. clin. Invest. *33*, 320 (1954). – J. Robbins, J. E. Rall, and R. W. Rawson, J. clin. Endocrinol. *15*, 1315 (1955). – L. J. De Groot, S. Postel, J. Litvak, and J. B. Stanbury, J. clin. Endocrinol. *18*, 158 (1958). – C. Cameron and K. Fletcher, Nature *183*, 116 (1959).

[26] J. Tata, J. E. Rall, and R. W. Rawson, J. clin. Endocrinol. *16*, 1554 (1956).

[27] W. P. Deiss, E. C. Albright, and F. C. Larson, J. clin. Invest. *31*, 1000 (1952).

[28] Y. Derrien, R. Michel, K. Pedersen, and J. Roche, Biochim. biophys. Acta *3*, 436 (1949). – I. J. O'Donnell, R. L. Baldwin, and J. W. Williams, Biochim. biophys. Acta *28*, 294 (1958).



Die pharmazeutischen
Spezialitäten SANDOZ
sind das Ergebnis
intensiver chemischer,
pharmakologischer
und medizinischer
Forschung.
Sie geniessen
das Vertrauen
des Arztes
in der ganzen Welt.

SANDOZ A.G., BASEL

MAGGIONI & C. S.p.A.

MILANO (Italy) – Via G. Colombo, 40

Original products from our

Research Laboratories

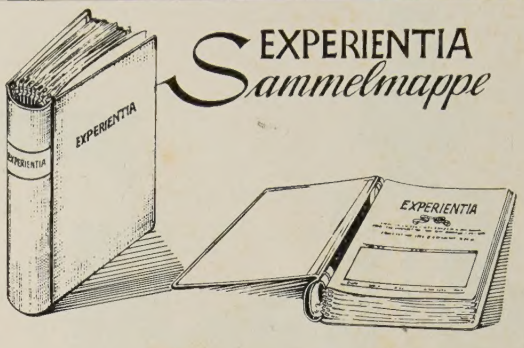
Coralgil
(4,4′-diethylaminoethoxy-α,β-diethyl-diphenyl ethane)
coronary vasodilator

Elvetil
(triethyl-(β-4-stilbenoxy-ethyl)-ammonium iodide)
parasympathotropic ganglioplegic

Fluidemin
(p-bromophenyl-indandione)
synthetic anticoagulant

Idro P_2
(4-methyl-esculetol disulfate)
capillary protecting factor

Liosol
(diphenylyl-ethylacetic acid)
hypocholesterolemic agent



EXPERIENTIA
Sammelmappe

Diese Mappe hat den Zweck, die Hefte des laufenden Jahrganges zusammenzuhalten, bevor der komplette Jahrgang gebunden werden kann. Die einzelnen Hefte können mittels einer neuartigen patentierten Haltevorrichtung in die Mappe eingeheftet und im Bedarfsfall wieder herausgelöst werden. Mit dieser geschmackvoll in Kunstleder gebundenen Mappe soll dem Übelstand abgeholfen werden, dass einzelne Hefte im Laufe des Jahres verlorengehen und vor dem Einbinden nachbezogen werden müssen. Die Sammelmappe ist so massiv konstruiert, daß sie ihren Dienst auf Jahre hinaus leisten wird.

Preis in Kunstleder gebunden: Fr. 6.75

— — — — — — — — — — — — — —

BESTELLSCHEIN

An den Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz)
Ich bestelle... Sammelmappe(n) zum Preise von Fr. 6.75

Name: Vorname:

Ort: Strasse:

Bitte in Blockschrift schreiben

Neuerscheinung

ELEKTRIZITÄTSLEHRE

Von Heinz Schilt, Privatdozent an der Universität Bern, mit einem Geleitwort von W. Pauli. 216 Seiten mit 187 Figuren. (1959). In Ganzleinen Fr. 24.– (DM 24.–). Physikalische Reihe, Band 3. Sammlung «Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften».

Aus dem Inhalt: 1. Grundbegriffe und Elektrostatik. 2. Das stationäre elektrische Feld. 3. Das stationäre magnetische Feld und langsam veränderliche Felder. 4. Rasch veränderliche Felder. 5. Anhang.

Es besteht heute noch ein gewisser Gegensatz zwischen einer elementaren Elektrizitätslehre und der wissenschaftlich gültigen Maxwellschen Theorie der Elektrizität. Das Buch von Schilt führt den Leser mit einfachen mathematischen Methoden in die Maxwellsche Auffassung der Elektrizität ein und stellt anhand vieler Beispiele den Zusammenhang mit der Praxis her. Es gibt der elementaren Lehre neue Impulse, die zum Überwinden des erwähnten Gegensatzes notwendig sind, und hilft damit dem Anfänger über unnötige Schwierigkeiten hinweg.

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART